

Yersinia enterocolitica YscV:
Charakterisierung einer essentiellen
Komponente des
Typ-III-Proteintransportapparates

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Franziska Faber
aus Dresden

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

2. Referent: Privatdozent Dr. Gottfried Wilharm

eingereicht am: 14.03.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.04.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Faber, F. und Wilharm, G.: Characterization of the *Y. enterocolitica* type III secretion system component YscV. (Poster). 1. Nationale Yersinia Konferenz, Braunschweig (2007).

Faber, F. und Wilharm, G.: Expression, purification, refolding and characterization of the transmembrane protein YscV from *Yersinia enterocolitica*. (Poster). 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden (2008).

Faber, F. und Wilharm, G.: Approaches to purify the type III secretion system component YscV from *Yersinia enterocolitica* for structural characterization. (Poster). 3. Joint Conference der Jahrestagungen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover (2010).

Faber, F. und Wilharm, G.: Insights into the structure of the type III secretion system component YscV from *Yersinia enterocolitica*. (Poster). 2. Nationale Yersinia Konferenz, Herrsching (2010).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Zusammenfassung	xii
1 Einleitung	1
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i> und ihre Evolution	1
1.2 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2
1.2.1 Epidemiologie und Klinik	2
1.2.2 Pathogenese	3
1.3 Das Virulenzplasmid von <i>Y. enterocolitica</i>	4
1.3.1 Das Adhäsın YadA	5
1.3.2 Effektorproteine	5
1.3.3 Chaperone	7
1.4 Das Typ-III-Sekretionssystem	10
1.4.1 Typ-III-Sekretionssysteme und ihre Verwandtschaft zu den Flagellen	10
1.4.2 Die Rolle der ATPase und die Protonen-motorische Kraft . . .	10
1.4.3 Transportsignal	12
1.4.4 Aufbau und Assemblierung des T3SS	13
1.4.4.1 Basalkörper	13
1.4.4.2 Nadel und Nadelspitze	14
1.4.4.3 Translokatoren YopB und YopD	15
1.4.4.4 Exportapparat	16
1.4.4.5 Assemblierung	17
1.5 YscV - eine Komponente des Exportapparates	18
1.6 Zielstellung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Software	20

2.2	Vektoren und Plasmide	21
2.3	Oligonukleotide	22
2.4	Bakterienstämme	23
2.5	Medien	23
2.5.1	Medien	23
2.5.2	Antibiotika und Medienzusätze	24
2.6	Kultivierung und Stammhaltung	24
2.6.1	Kultivierung	24
2.6.2	Stammhaltung	24
2.7	Molekularbiologische Methoden	25
2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.7.2	Gewinnung von Bakterien-Schnellysaten	25
2.7.3	DNA-Fällung	25
2.7.4	Konzentrationsbestimmung	25
2.7.5	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	25
2.7.6	Sequenzierung	26
2.7.7	Agarosegelelektrophorese	26
2.7.8	DNA-Isolierung aus dem Agarosegel	27
2.7.9	Enzymatische Modifizierung von DNA	27
2.7.9.1	Restriktionsverdau	27
2.7.9.2	Dephosphorylierung	27
2.7.9.3	Ligation	27
2.7.10	Transformation von DNA	28
2.7.10.1	Herstellung elektrokompetenter <i>Y. enterocolitica</i>	28
2.7.10.2	Elektroporation von <i>Y. enterocolitica</i>	28
2.7.10.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	28
2.8	Proteinbiochemische Methoden	28
2.8.1	Quantitative Proteinbestimmung	28
2.8.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.8.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.8.2.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)	29
2.8.2.3	Die <i>BlueNative</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese (BN- PAGE)	30
2.8.3	Detektion von Proteinen	31
2.8.3.1	Färbung von Proteinen mit Coomassie [®] -R250	31
2.8.3.2	Immunochemischer Nachweis von Proteinen im <i>Western Blot</i>	31
2.8.3.3	Antikörper	32
2.8.4	Quervernetzung von Proteinen - <i>Crosslinking</i>	33
2.9	Expression und Reinigung von Proteinen	33

2.9.1	Aufreinigung und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	33
2.9.2	Reinigung von Proteinen mit Poly-Histidin-Epitop	34
2.9.2.1	Expression von Poly-Histidin-Fusionen	34
2.9.2.2	Reinigung von Poly-Histidin-Fusionen	35
2.9.3	Reinigung von MBP(Maltose-Bindeprotein)-Fusionsproteinen .	36
2.9.3.1	Expression von MBP-Fusionsproteinen	36
2.9.3.2	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	36
2.9.3.3	Faktor Xa-Verdau von MBP-Fusionsproteinen . . .	37
2.9.4	Koexpressionsversuche mit molekularen Chaperonen	38
2.9.5	Gelfiltration	38
2.9.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	39
2.9.7	Umpuffern von Proteinlösungen	39
2.9.8	Rückfaltung von YscV	40
2.9.9	Vorliegende Proteinpräparationen	40
2.10	Analyse der Yop-Sekretion	41
2.11	Herstellung polyklonaler Antikörper	41
2.12	Transmissionselektronenmikroskopie	42
2.12.1	Probenpräparation und Probenaufnahme	42
2.12.2	Bildbearbeitung	43
2.13	Röntgenkleinwinkelstreuung	44
3	Ergebnisse	46
3.1	<i>in silico</i> Charakterisierung der Struktur und Membrantopologie von YscV	46
3.2	Strategien zur Reinigung von YscV _c	49
3.2.1	Generelle Klonierungsstrategie	49
3.2.2	Reinigung von YscV _c als Histidin-Fusionsprotein	50
3.2.2.1	Klonierung	50
3.2.2.2	Expression und Reinigung	50
3.2.3	Rückfaltung von HisYscV _{c378}	53
3.2.4	Herstellung eines polyklonalen YscV-Antikörpers	55
3.2.5	Die Überproduktion von YscV aktiviert die Hitzeschockproteine IbpAB	55
3.2.6	Koexpression von YscV _c mit molekularen Chaperonen	58
3.2.7	Reinigung von YscV _c als MBP-Fusionsprotein	62
3.2.7.1	Klonierung	62
3.2.7.2	Expression und Reinigung	64
3.3	Strukturelle Charakterisierung von YscV _c	67
3.3.1	MBPYscV _c assembliert zu oligomeren Komplexen	67
3.3.2	MBPYscV _{c378} bildet stabile Ringstrukturen	72

3.3.3	Berechnung eines Modells von MBPYscV _{c378} aus Röntgen- kleinwinkelstreudaten	75
3.4	Funktionelle Charakterisierung von YscV	77
3.4.1	Überexpression von YscV reprimiert die Yop-Sekretion in <i>Y. en-</i> <i>terocolitica</i>	77
3.4.2	YscV interagiert mit Substraten des T3SS	79
3.4.2.1	Identifizierung von Interaktionspartnern in der Nativ- PAGE	80
3.4.2.2	Identifizierung von Interaktionspartnern mittels che- mischer Quervernetzung (Crosslinking)	82
4	Diskussion	85
4.1	Das Typ-III-Sekretionssystem und seine essentielle Komponente YscV	85
4.2	Die zytoplasmatische Domäne von YscV verhält sich unerwartet instabil	87
4.3	YscV _c assembliert zu hocholigomeren Komplexen	89
4.4	Die YscV Oligomere bilden stabile Ringstrukturen aus	92
4.5	YscV _c interagiert mit einem sekretierten Regulator des T3SS	94
4.6	Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	99
	Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

1.1	Verlauf einer Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	4
1.2	Aktivität der Yop-Effektoren in der Wirtszelle	8
1.3	Vergleich der Strukturen des Flagellums und des Injektisoms	11
1.4	Morphologie und Komponenten des T3SS	15
1.5	Assemblierung des T3SS von <i>Y. enterocolitica</i>	17
2.1	Flussdiagramm zur Bildbearbeitung der TEM-Aufnahmen	44
3.1	Membrantopologievorhersage von YscV	47
3.2	ClustalW Alignment von YscV mit InvA des NF-T3SS und FlhA des F-T3SS von <i>S. enterica</i>	48
3.3	Homologie-basierte 3D-Strukturvorhersage der zytoplasmatischen Do- mäne von YscV	49
3.4	Konstruktion des Plasmides pHisYscV _{c326}	51
3.5	Aufreinigung von HisYscV _c	52
3.6	Rückfaltung von denaturierend aufgereinigtem HisYscV _{c378}	54
3.7	Validierung des anti-YscV Serums aus Kaninchen	55
3.8	Anreicherung der Hitzeschockproteine IbpAB in <i>inclusion bodies</i> von YscVHis und HisYscV _{c378}	56
3.9	Massenspektrometrische Identifizierung von IbpAB in <i>inclusion bo- dies</i> von YscVHis und HisYscV _{c378}	57
3.10	Koexpression von HisYscV _{c378} mit den Chaperon Systemen DnaKJ- GrpE und GroEL-ES	59
3.11	Affinitätschromatografische Reinigung von löslichem HisYscV _{c378} nach Koexpression mit DnaKJ-GrpE und GroEL-ES	61
3.12	Konstruktion des Plasmids pMBPYscV _{c326}	63
3.13	Evaluierung der optimalen Expressionstemperatur für pMBPYscV _{c326} und pMBPYscV _{c378} in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	64
3.14	Affinitätschromatografische Reinigung von MBPYscV _c über MB- PTrap HP (5 ml)	65
3.15	Faktor Xa Verdau von MBPYscV _{c326} zur Entfernung des N-Terminale MBP-Tag	66

3.16	Analyse des Oligomerisierungsgleichgewichtes von MBPYscV _{c378} und MBPYscV _{c326} mittels analytischer Gelfiltration	69
3.17	Analyse der Oligomerisierung von MBPYscV _{c378} und MBPYscV _{c326} in der Nativ-PAGE	71
3.18	TEM-Analyse von MBPYscV _{c326} Oligomeren	73
3.19	TEM-Analyse von MBPYscV _{c378} Oligomeren	74
3.20	Modell eines oktameren Ringes von MBPYscV _{c378}	76
3.21	YscV Überexpression inhibiert die Yop Sekretion	78
3.22	Analyse der Wechselwirkung von YscV _{c326} mit YscM2, YopH und SycH	81
3.23	Analyse der Wechselwirkung zwischen YscV _{c326} und YscM2	84
4.1	Rekonstruktion des Basalkörpers des T3SS	86
4.2	Verteilung hydrophober Aminosäuren in den zytoplasmatischen Domänen von YscV, InvA und FlhA	89
4.3	Modell der Lokalisierung von FlhA innerhalb der Strukturen des MS-Ringes und des zytoplasmatischen Rotors	91
4.4	Die T3SS Membranproteine teilen konservierte Strukturmotive in ihren periplasmatischen/zytoplasmatischen Domänen	93

Tabellenverzeichnis

2.1	Software Programme	20
2.2	Vektoren	21
2.3	Rekombinante Plasmide	21
2.4	Oligonukleotide	22
2.5	Bakterienstämme	23
2.6	Antibiotika und Medienzusätze	24
2.7	Zusammensetzung der SDS-Gele	29
2.8	Antikörper	32
2.9	Crosslinking Agenzien	33
2.10	Dialyse-Einheiten	39
2.11	Screening Bedingungen für die Proteinrückfaltung	40
2.12	Proteinpräparationen	41
2.13	Immunisierungsprotokoll	42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BN-PAGE	Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
β-ME	β -Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDM	Dodecylmaltosid, nicht-ionisches Detergenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
etc.	lat. <i>et cetera</i> , und so weiter
F-T3SS	Flagellen Typ-III-Sekretionssystem
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GndHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase

h	Stunde, Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
IB	engl. <i>inclusion bodies</i> , Einschlusskörper
IM	innere Membran
IMAC	engl. <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IMR	innerer Membranring
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
i.R.	in der Regel
Km	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
lat.	latein
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min.	Minute, Minuten
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
NF-T3SS	nicht-flagelläres Typ-III-Sekretionssystem
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ÄM	äußere Membran
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase-chain-reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
pH	lat. <i>potentium hydrogenii</i>
PMF	engl. <i>proton motive force</i> , Protonen-motorische Kraft
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP-HPLC	engl. <i>Reversed-Phase High-Performance-Liquid Chromatography</i> , Hydrophobizitäts-Flüssigchromatografie
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, Sekunden
S.	<i>Salmonella</i>

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Sh.</i>	<i>Shigella</i>
sog.	sogenannt (-e, -er)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloracetat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	engl. <i>Tobacco etch virus</i>
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T2SS	Typ-II-Sekretionssystem
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
T3S	Typ-III-Sekretion
usw.	und so weiter
UTR	engl. <i>untranslated region</i> , nicht translatierter Bereich
V	Volt
vgl.	vergleiche
w/v	engl. <i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
w/w	engl. <i>weight per weight</i> , Masse pro Masse
Y.	<i>Yersinia</i>
YFP	engl. <i>yellow fluorescent protein</i>
Yop(s)	engl. <i>Yersinia outer protein(s)</i>
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Gattung *Yersinia* umfasst 15 Spezies, von denen 3 Vertreter human-pathogene Erreger sind. Zu ihnen zählen *Y. pestis*, der Erreger der Beulen- und Lungenpest, sowie *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, zwei enteropathogene Krankheitserreger. Diese 3 human-pathogenen Spezies besitzen ein Virulenzplasmid, welches ein für die Virulenz essentielles Typ-III-Proteinsekretionssystem (T3SS) kodiert. Es dient der Translokation von Virulenzproteinen (Yops) in verschiedene Wirtszellen, um Mechanismen der Immunabwehr zu unterwandern und somit eine Infektion zu etablieren. In dieser Arbeit wurde YscV, eine essentielle Komponente des *Yersinia* T3SS, charakterisiert. YscV ist über mehrere Transmembranhelices in der inneren Membran verankert und besitzt eine große zytoplasmatische Domäne. Bisher gibt es kaum Daten zur Struktur und Funktion dieses Proteins. Die Analyse von homologen T3SS Komponenten legte bisher nahe, dass sie als Monomer oder Dimer vorliegen und durch die Interaktion mit dem T3SS-spezifischen ATPase Komplex an der Erkennung und dem Transport von Substraten beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern nun neue Erkenntnisse bezüglich der Struktur und Funktion von YscV. Verschiedene Analysen der zytoplasmatischen Domäne YscV_c mittels Gelfiltration und nativer Gelelektrophorese-Techniken zeigten übereinstimmend, dass YscV_c oligomerisiert, wobei offensichtlich das Dimer als Grundbaustein für die weitere Polymerisation dient, da nur geradzahlige Oligomere nachweisbar waren. Mithilfe von Elektronenmikroskopie und Kleinwinkelstreuanalysen wurde erstmals gezeigt, dass die hocholigomeren Komplexe eine Ringstruktur einnehmen. Diese Ergebnisse erfordern ein ganz neues Modell für die stöchiometrische und strukturelle Eingliederung von YscV in den T3S-Apparat und eröffnen neue Aspekte für mögliche Funktionen im T3-Sekretionsprozess. Weiterhin zeigte die Überexpression von YscV einen starken inhibitorischen Effekt auf die Yop Sekretion, was eine Wechselwirkung von YscV mit Substraten des T3SS nahelegte. In anschließenden Crosslinking-Analysen konnte ein Substrat des T3SS als Interaktionspartner von YscV identifiziert werden. Es handelt sich um das T3SS Regulatorprotein YscM2, dessen T3-abhängige Ausschleusung aus der Bakterienzelle zu einer Hochregulierung der Yop-Expression führt. Dies deutet eine wichtige Funktion für YscV in der Regulation der T3-Sekretion an und könnte die pleiotropen Effekte einer *yscV*-Deletion erklären, welche unter anderem eine verminderte Expression mehrerer T3SS-spezifischer Operone umfassen.

1. Einleitung

Nachdem der Schweizer Arzt Alexandre Jean Emil Yersin 1894 erstmals den Pesterreger *Yersinia pestis* entdeckte und in Reinkultur anlegte, war der Fokus der Forschung für lange Zeit zunächst nur auf diesen Erreger und auf den zweiten bekannten Vertreter der Gattung, *Yersinia pseudotuberculosis*, gerichtet. Erst in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde auch die dritte humanpathogene Spezies *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) beschrieben, zunächst jedoch noch unter dem Namen *Flavobacterium pseudomallei* bzw. *Bacterium enterocoliticum* [108]. Danach wurde es wieder ruhig um *Y. enterocolitica* und erst seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wird auch dieser dritte humanpathogene Vertreter intensiv erforscht. Yersinien zählen nach *Campylobacter* und *Salmonella* zu den häufigsten bakteriellen Erregern lebensmittelbedingter Infektionskrankheiten, deren komplexe Infektionsstrategie bis heute nicht vollständig verstanden ist.

1.1 Die Gattung *Yersinia* und ihre Evolution

Die Gattung *Yersinia* umfasst 15 Spezies (*Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. philomiragia*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis*), von denen jedoch nur *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* humanpathogen sind. Yersinien gehören nach der heutigen Systematik zur Familie der *Enterobacteriaceae* (γ -Proteobakterien), die auch andere humanpathogene Gattungen wie *Salmonella*, *Escherichia* und *Shigella* umfasst. Yersinien sind gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die keine Sporen ausbilden. Sie liegen bei 25°C peritrich flagelliert vor und sind motil. Yersinien besitzen die Fähigkeit, sich auch bei niedrigen Temperaturen bis 4°C zu vermehren. Dies stellt durchaus eine Problematik dar, da es sich um Erreger handelt, welche vorwiegend durch kontaminierte Lebensmittel übertragen werden.

Y. pestis ist der Erreger der Pest und verantwortlich für drei humane Pest-Pandemien, welche sich über verschiedene Routen global ausbreiteten und auch Europa erreichten: die Justinianische Pest (5.-7. Jahrhundert), der Schwarze Tod (13.-15. Jahrhundert) und die Pest-Pandemie der modernen Zeit, welche seit der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts anhält, obwohl sie heute stark eingedämmt und auf wenige Länder

und Regionen beschränkt ist [1]. Das Hauptreservoir für *Y. pestis* sind Nagetiere, von denen ausgehend der Erreger über infizierte Flöhe auf uns Menschen übertragen wird und zur Ausbildung der Beulen- oder Lungenpest führt. Damit unterscheidet sich *Y. pestis* grundlegend von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, bei denen es sich um enteropathogene Krankheitserreger handelt, die hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel übertragen werden und in der Regel Gastroenteritiden verursachen, die sich nur selten systemisch ausweiten [108]. Die Entstehung der drei Spezies geschah in zwei großen evolutionären Aufspaltungen: bereits vor 41-186 Mio. Jahren spalteten sich *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* in zwei Linien auf. Erst sehr viel später, vor 1,500-20,000 Jahren, entstand *Y. pestis* aus *Y. pseudotuberculosis* [1], also kurz vor dem Auftreten der ersten großen Pest-Pandemie. Warum jedoch ausgerechnet *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, die evolutionär so eng verwandt sind, solch fundamentale Unterschiede in ihrem Lebenszyklus und ihrer Pathogenese aufweisen, ist auch heutzutage noch nicht umfassend verstanden.

1.2 *Yersinia enterocolitica*

1.2.1 Epidemiologie und Klinik

Die Spezies *Y. enterocolitica* ist eine biochemisch, serologisch und genetisch sehr heterogene Gruppe von Organismen. Diese Tatsache zeigt sich unter anderem in einem auffallend geringen Kern-Genom von nur 20,8 % [64]. Aufgrund der biochemischen Heterogenität wird *Y. enterocolitica* in 6 Biotypen klassifiziert (1A, 1B, 2, 3, 4, 5), basierend auf Stoffwechseleigenschaften wie der Verwertung bestimmter Zucker, Nitratreduktion oder Indolproduktion [170]. Diese Biotypen korrelieren teilweise mit bestimmten Serovaren und interessanterweise verursachen nur einige dieser Bioserotypen humane Infektionen. Dazu zählen die Bioserotypen 1B/O:8, 2/O:9, 2/O:5,27, 3/O:3 und 4/O:3, wobei der Bioserotyp 4/O:3 weltweit am häufigsten auftritt [46]. *Y. enterocolitica* Stämme werden in hoch-pathogene (Biotyp 1B) und niedrig-pathogene (Biotyp 2-5) Stämme unterschieden. Die hochpathogenen Stämme sind bereits in niedrigen Infektionsdosen lethal für Mäuse und sind beim Menschen häufiger mit systemischen Krankheitsverläufen assoziiert. Sie kommen vorwiegend in den USA vor. Die niedrig-virulenten Stämme sind nicht-lethal für Mäuse, verursachen meist milde Durchfallerkrankungen und treten weltweit auf. Der markanteste genetische Unterschied zwischen diesen Stämmen ist das Vorhandensein der chromosomal lokalisierten Pathogenitätsinsel HPI (engl. *high-pathogenicity island*). Sie kodiert für ein Eisenaufnahmesystem, welches für die systemische Verbreitung der Yersinien im Wirtsorganismus wichtig ist [29].

Zu den häufigsten Manifestationen von *Y. enterocolitica* Infektionen zählt die Gastroenteritis, manchmal auch unter Einbeziehung des Dickdarmes (Enterokolitis).

Vor allem bei Kleinkindern kann der Durchfall blutig und von hohem Fieber begleitet sein. Bei Erwachsenen sind eine akute mesenteriale Lymphadenitis und Erythema nodosum häufiger. Septikemien können auftreten, sind aber sehr selten. Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* kann auch zu sekundären immunologischen Erkrankungen wie z.B. der reaktiven Arthritis führen [19]. In der Regel ist die Erkrankung selbstlimitierend und eine antibiotische Therapie nicht notwendig. Als Hauptreservoir humanpathogener *Y. enterocolitica* gelten Schweine, insbesondere Mastschweine, aus deren Tonsillen *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 häufig isoliert wird [23]. *Y. enterocolitica* kommt aber auch in anderen Tierarten, wie Haus- und Nagetieren vor. In der Regel sind Tiere asymptomatische Träger. Die wichtigste Grundlage der Virulenz ist das pYV Plasmid (*Yersinia* Virulenz), welches nur in den Biotypen 1B und 2-5 vorliegt. Da es im Biotyp 1A also fehlt, galten diese Stämme lange als apathogen. Diese Sicht muss jedoch revidiert werden, da *Y. enterocolitica* Biotyp 1A Stämme immer wieder in Patienten mit klinischen Symptomen nachgewiesen werden und mittlerweile bei mehreren Ausbrüchen (2 nosokomiale und 2 Lebensmittel-assoziierte) als ursächlicher Erreger diagnostiziert wurden [14].

1.2.2 Pathogenese

Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* geschieht in den meisten Fällen über die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser. Dadurch gelangen die Bakterien über den Magen in den Dünndarm. Hier können sie in einer sehr frühen Phase der Infektion an M-Zellen des Dünndarmepithels adhären und in die Peyer'schen Plaques, auf der basolateralen Seite des Darmepithels, translozieren. Dies geschieht über das Oberflächenprotein Invasin, welches β 1-Integrine auf der Oberfläche der M-Zellen erkennt und bindet [144]. M-Zellen befinden sich im Follikel-assoziierten Epithel, welches den Peyer'schen Plaques aufliegt und sind auf die Aufnahme von Antigenen aus dem Darmlumen spezialisiert.

In den Peyer'schen-Plaques adhären die Yersinien an Makrophagen und andere Zellen der lymphatischen Follikel über mindestens ein weiteres Oberflächenprotein, YadA, das im Gegensatz zu Invasin erst bei 37 °C exprimiert wird [66]. Diese Adhäsion ist Voraussetzung für die Translokation von Virulenzproteinen in die Wirtszellen über ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS). Dadurch wird die Phagozytose der Yersinien und die Aktivierung von B- und T-Zellen inhibiert, wodurch sich die Yersinien extrazellulär vermehren und die Infektion manifestieren können. Anschließend disseminieren sie zu anderen Geweben und Organen, wie Lymphknoten, Leber und Milz, wo sie sich extrazellulär vermehren und Mikroabszesse bilden [163]. Der Mechanismus dieser Ausbreitung ist jedoch noch nicht im Detail verstanden. Abbildung 1.1 gibt noch einmal einen schematischen Überblick über den Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica* beim Menschen.

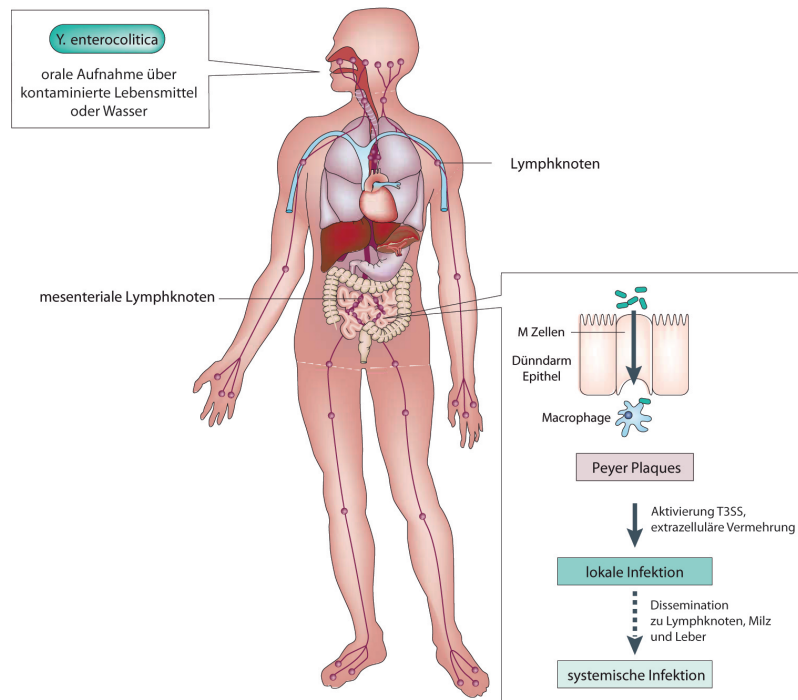


Abbildung 1.1: Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica*

Die Infektion erfolgt in der Regel über die orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel oder Wasser. Anschließend gelangen die Yersinien über M-Zellen im Dünndarmepithel in die darunter liegenden Peyer'schen Plaques. Hier vermehren sie sich extrazellulär, indem sie ihre Phagozytose und die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr durch die Aktivität des T3SS verhindern (lokale Infektion). Danach kann es zu einer Dissemination der Yersinien zu peripheren Lymphknoten und Organen und der Etablierung einer systemischen Infektion kommen. (adaptiert aus Wren *et al.* [177])

1.3 Das Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica*

Alle drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies besitzen das 70 kb pYV (*Yersinia* Virulenz) Plasmid, welches unter anderem für ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), mehrere Effektorproteine (Yops, *Yersinia outer proteins*), spezifische Chaperone und das Adhäsın YadA kodiert. Dieses Virulenzplasmid ist notwendig für die Etablierung einer Infektion. Die Gene, welche für die Proteine des T3SS kodieren, sind in vier Operons organisiert: *virA*, *virB*, *virC* und *virG*. Ihre Expression wird durch Temperatur und den Transkriptionsaktivator VirF reguliert: bei 37°C wird die kompakte Konformation der DNA im Promotorbereich dieser Gene aufgeschmolzen, so dass anschließend VirF die Expression aktivieren kann [132, 131]. Bisher wurden 7 Effektorproteine identifiziert (YopH, YopE, YopM, YopT, YopO, YopJ und YopQ), die durch das T3SS in eukaryotische Wirtszellen injiziert werden. Ihre Ziele in der Wirtszelle sind zelluläre Komponenten, die vor allem Prozesse der angeborenen Immunabwehr einleiten und regulieren. Somit stellt das Virulenzplasmid mit seinen Pathogenitätsfaktoren die zentrale Waffe in der Umgehung der ersten Barriere des humanen Immunsystems und damit in der Etablierung einer Infektion dar.

1.3.1 Das Adhäsın YadA

Der Name YadA steht für *Yersinia* Adhäsın A und es handelt sich um das einzige Plasmid-kodierte Adhäsın in *Yersinia*. YadA wurde ursprünglich elektronenmikroskopisch als eine fibrilläre Struktur auf der Bakterienoberfläche identifiziert [72]. Es handelt sich um den Vertreter einer Klasse von Autotransporteradhäsinen, welche C-terminal in der äußeren Membran verankert sind und zu Trimeren assemblieren [129]. YadA ist ein essentieller Virulenzfaktor von *Y. enterocolitica*. Es vermittelt die Serumresistenz der Yersinien, indem es die Opsonisierung durch C3b des Komplementsystems verhindert [31]. Außerdem bindet es an zahlreiche Strukturen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin [145, 157, 45] und vermittelt so indirekt, über die Bindung der extrazellulären Matrix an β 1-Integrine, die Adhäsion an Wirtszellen. Diese Bindung ist eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung des T3SS und damit für die Modulation des Immunsystems durch die Yersinien. Damit übereinstimmend zeigt eine *Y. enterocolitica yadA* Deletionsmutante eine verminderte Persistenz in den Peyer'schen Plaques und als Folge eine verminderte Dissemination zu anderen Organen [72, 130].

1.3.2 Effektorproteine

Es sind bisher 7 Effektorproteine identifiziert, die während des Infektionsprozesses durch das T3SS in verschiedene Wirtszellen transloziert werden. Sie besitzen vielfältige biochemische Funktionen, welche der Modulation zellulärer Signalwege und damit der Abwehr des Immunsystems dienen. Allen ist gemeinsam, dass ihre Expression nach dem Kontakt zu einer Wirtszelle verstärkt wird [119] und dass sie ein N-terminales Sekretionssignal von ungefähr 15 Aminosäuren besitzen, welches nicht nach dem Transport abgespalten wird [150].

YopH ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase), welche die höchste bisher bekannte Phosphatase-Aktivität besitzt. YopH beherbergt im N-Terminus eine Binde- und Erkennungsdomäne für phosphorylierte Tyrosine. Im C-Terminus befindet sich das katalytische Zentrum für die Phosphatase-Aktivität des Effektors. Die Kristallisierung des C-Terminus ergab, dass die Struktur des katalytischen Zentrums der von eukaryotischen PTPasen stark ähnelt und es wird daher über einen eukaryotischen Ursprung des Proteins spekuliert [120, 155]. Zelluläre Zielproteine von YopH sind Bestandteile von fokalen Adhäsions-Komplexen (p130^{Cas}, FAK, u.a.), welche die Invasin-basierte Aktivierung von β 1-Integrinrezeptoren an das Zellzytoskelett signalisieren und damit die Internalisierung der Bakterien einleiten. YopH inhibiert diese Aktivität durch die Dephosphorylierung dieser Komponenten und hemmt damit die Phagozytose der Bakterien [115, 16].

YopE ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP). Mit dieser Aktivität inhibiert

es kleine G-Proteine, indem es ihre intrinsische GTPase Aktivität erhöht und sie somit in den GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführt. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass YopE G-Proteine der RhoA-Familie inhibiert, zu denen RhoA, Rac1 und Cdc42 gehören [17]. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Assemblierung des Aktin-Zytoskeletts. Durch die Infektion mit *Yersinia* kommt es zur YopB-vermittelten Aktivierung dieser G-Proteine, was zur Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden führt. Durch die GTPase Funktion von YopE werden diese Prozesse revertiert und somit eine Aktivierung des Immunsystems und die Phagozytose der Yersinien durch die infizierte Zelle verhindert [166, 167].

YopT führt nach seiner Translokation in die Wirtszellen, ähnlich YopE, zur Zerstörung von Aktinfilamenten [180]. Die zellulären Zielproteine sind auch wie bei YopE kleine G-Proteine der RhoA-Familie. Der Mechanismus ihrer Inaktivierung ist jedoch ein ganz anderer. YopT ist eine Papain-ähnliche Cystein Protease, welche Prenylgruppen am C-Terminus der G-Proteine spaltet [146]. Diese Prenylgruppen dienen der Verankerung der Proteine in der Zellmembran und ihre Abspaltung führt zu einer Delokalisation und damit Inaktivierung der G-Proteine.

YopO ist ein Multidomänen Protein. N-terminal beherbergt es eine Serin/Threonin-Kinase Domäne und der C-Terminus besitzt sowohl die Funktion eines Guanidin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitors (GDI) als auch eine Aktin-Binde-Domäne. Das zelluläre Ziel der Serin/Threonin-Kinase Domäne ist Gαq, eine Unterfamilie von G-Proteinen, welche unter anderem Rho-vermittelte Signalwege aktivieren [109]. In seiner Funktion als GDI bindet YopO Mitglieder der Rho-Familie in ihrem GDP-gebundenen Zustand und verhindert somit ihre Reaktivierung durch den Austausch von GDP gegen GTP [124]. Die verschiedenen Funktionen von YopO haben also das gemeinsame Ziel, die Phagozytose der Bakterien durch infizierte Zellen zu verhindern.

YopP ist eine Acetyltransferase, welche die Aktivität zahlreicher zellulärer Kinasen durch die Acetylierung von Serin- und Threoninresten inhibiert [135]. Dazu zählen unter anderem Mitglieder der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) Superfamilie, durch deren Inaktivierung nachgeschaltete Kinasen inhibiert werden. YopP inaktiviert auch IKKβ, die katalytische Untereinheit eines Multiproteinkomplexes, welcher für die Aktivierung des NF-κB Signalweges nötig ist. Außerdem inhibiert es die TGF-β-aktivierte Kinase-1 (TAK1), welche wiederum ein wichtiger Aktivator von MAPKK und des NF-κB Signalweges ist. Im Gesamtergebnis führt die Aktivität von YopP dazu, dass zentrale pro-inflammatorische Signalwege inhibiert werden und die Yersinien einem Angriff durch das Immunsystem entgehen. Außerdem wurde für Makrophagen und Dendritische Zellen gezeigt, dass YopP Apoptose induziert, ein Prozess bei dem es zum Absterben der Zelle kommt, ohne dass das Immunsystem aktiviert wird [135].

YopM ist ein mysteriöses Protein, seine Funktion ist noch nicht endgültig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass es wichtig für die Virulenz von *Y. pestis* in Mäu-

sen ist [86]. YopM besteht aus einer variablen Anzahl von Leucin-reichen Domänen (LRR, *leucine-rich-repeats*), die eine LRR-typische Hufeisen-förmige Konformation einnehmen. Die Kristallstruktur von YopM zeigt, dass sich 4 Monomere zu einem Tetramer zusammenlagern und einen hohlen Zylinder bilden [40]. YopM besitzt in seinem C-Terminus ein Kernimportsignal und wandert nach seiner Translokation über den Mikrotubuli-assoziierten Vesikeltransport in den Zellkern [148]. Es wurde gezeigt, dass es dort die Transkription von Zellzyklus- und Zellwachstums-regulierenden Genen beeinflusst, doch andere Arbeiten konnten diesen Effekt nicht bestätigen [139, 59]. Außerdem wurde in einem Mausinfektionsmodell mit *Y. pestis* gezeigt, dass YopM in einer frühen Phase der Infektion für eine globale Depletion von NK-Zellen und somit für eine schwere Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems verantwortlich ist [76]. Außerdem wurden *in vitro* zwei zelluläre Kinasen, PRK2 und RSK1, als Bindungspartner identifiziert, deren Aktivität durch die Interaktion mit YopM stimuliert wird [96]. Die nachgeschalteten Signaltransduktionswege sind jedoch noch nicht identifiziert worden. Neueste Arbeiten haben einen ganz neuen, spannenden Aspekt von YopM aufgedeckt. Rüter *et al.* konnten zeigen, dass YopM autonom über die Membranen verschiedener Zelltypen translozieren kann, ohne die Unterstützung zusätzlicher Faktoren und dass diese Eigenschaft durch den N-Terminus des Proteins vermittelt wird [134].

YopQ wird, wie auch die anderen Yops, durch das T3SS in Wirtszellen transloziert [49]. Es ist außerdem in allen drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies für die Virulenzausprägung wichtig [62, 107, 154]. Die Deletion von *yopQ* führt zu einer erhöhten Translokation der Yops [61]. Neueste Daten zeigen, dass dieses Phänomen mit einem Einfluß von YopQ auf die Ausbildung der Translokationspore in der Wirtszellmembran zusammenhängt [159]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass YopQ durch die Interaktion mit den Translokatoren die Erkennung des T3SS durch wirtszelluläre Proteine verhindert und dadurch die Caspase-1 Aktivierung unterbindet [21].

Abbildung 1.2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Aktivität und das Zusammenspiel der *Yersinia* Effektoren in der Wirtszelle.

1.3.3 Chaperone

Der Begriff Chaperon kommt von *engl. chaperone* und bedeutet Anstandsdame. Er beschreibt die Funktion der Chaperone als Faltungshelfer. Viele Proteintransportsysteme besitzen eigene, spezifische Chaperone, die die Substrate im Zytosol erkennen und binden und sie dem Transportsystem zuführen. Ein Beispiel ist das Sec-System mit seinem spezifischen Chaperon SecB [54].

Bei den Chaperonen des T3SS handelt es sich um kleine Proteine (14-19kD) mit einem niedrigen Isoelektrischen Punkt (pI 4.4-5.2) und einer C-terminalen amphiphilen α -Helix [162]. Ihre Aktivität ist ATP-unabhängig.

Sie werden in 5 Klassen eingeteilt, basierend auf ihrer Struktur und Funktionswei-

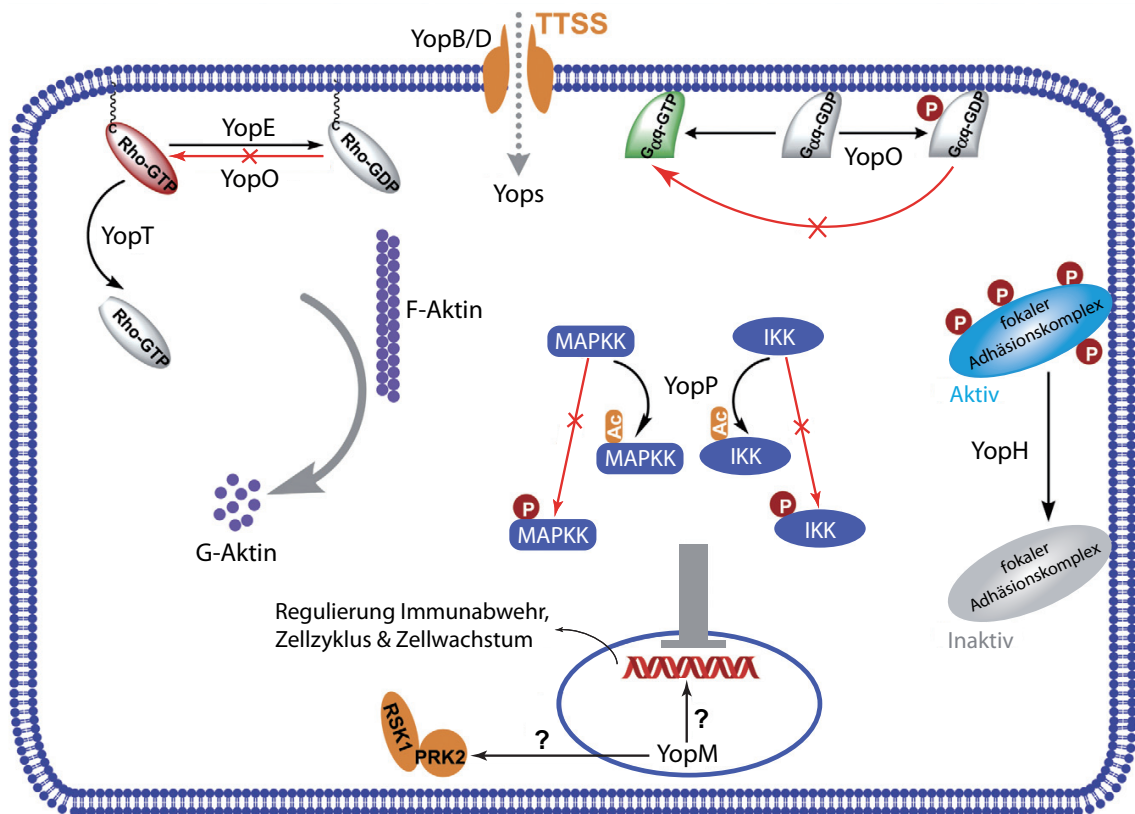


Abbildung 1.2: Aktivität der Yop-Effektoren in der Wirtszelle

YopH dephosphoryliert verschiedene Komponenten von fokalen Adhäsionskomplexen und unterbindet dadurch die Phagozytose der Bakterien. Die Effektoren YopE, YopO und YopT inaktivieren kleine G-Proteine der Rho-Familie, indem sie ihren GTP/GDP-gebundenen Zustand (YopE und YopO) oder ihre Membranlokalisation (YopT) modulieren, was zur Deassemblierung des Aktin Zytoskeletts führt. YopP inhibiert die Aktivität der zellulären Kinasen MAPKK und IKK, indem es Serin- und Threoninreste acetyliert. Dadurch werden wichtige Signalwege der angeborenen Immunabwehr inhibiert. YopM beeinflusst im Zellkern die Transkription von Zellzyklus- und Zellwachstums-regulierenden Genen. Außerdem interagiert es mit zwei Kinasen, deren nachgeschaltete Signalwege noch nicht aufgeklärt sind. (adaptiert aus Shao *et al.* [147])

se [113, 173]. Chaperone der Klasse I assistieren entweder einem (Klasse IA) oder mehreren (IB) Effektoren des T3SS. Chaperone der Klasse II binden die beiden Translokatoren des T3SS, YopB und YopD. Die Chaperone der Klassen IA und II sind meist in der Nähe der Gene ihrer Substrate kodiert. Klasse III Chaperone binden die Substrate des flagellären Typ-III-Exportapparates. Das Chaperon CsaA, welches das Filamentprotein EspA des *Escherichia coli* (*E. coli*) T3SS bindet, bildet eine eigene Klasse (Klasse IV). Das Chaperon YscE, welches gemeinsam mit dem Cochaperon YscG das Nadelprotein YscF von *Yersinia* bindet, bildet ebenfalls eine eigene Klasse (Klasse V), da es keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Strukturen aufweist.

Mittlerweile gibt es mehrere Kristallstrukturen von *Yersinia* Chaperonen der Klasse I, zum Beispiel: SycE [41, 160], SycH [121], SycT [92] und SycN [143]. Obwohl

sie untereinander keine Sequenzähnlichkeiten aufweisen, haben sie doch strukturelle Gemeinsamkeiten: sie liegen als Dimer vor und sie besitzen eine konservierte Faltung aus 5 β -Faltblättern und 3 α -Helices. Von den sechs bekannten *Yersinia* Effektoren haben YopH [168], YopE [169], YopT [65] und YopO [85] ein Chaperon. Außerdem konnte für LcrQ/YscM1 (*Y. pseudotuberculosis*/*Y. enterocolitica*), einem translozierten Regulator der Yop-Expression, gezeigt werden, dass er von SycH gebunden wird [26]. Für die Effektoren YopM und YopP konnte bisher kein Chaperon identifiziert werden.

Die Funktion der Chaperone wird immer noch kontrovers diskutiert und es existieren unterschiedliche Modelle.

Ein Modell geht davon aus, dass die T3SS Chaperone ihre Substrate in einem entfalteten bzw. teilweise gefalteten Zustand halten, welcher sie für die T3-Sekretion befähigt, da die T3-Nadel aufgrund ihres geringen Durchmessers nur die Translokation von ungefalteten Proteinen zulässt [153].

Letzelter *et al.* konnten zeigen, dass SycO die intrabakterielle Aggregation von YopO verhindert, indem es durch seine Bindung eine N-terminale Membran-Lokalisierungs-Domäne von YopO maskiert. Da viele Effektoren solche Domänen besitzen und in der Wirtszelle mit Membranen assoziieren, postulieren sie, dass eine Aggregationsverhinderung die primäre Funktion der Chaperone sein könnte [85].

Chaperone binden nur einen kleinen N-terminalen Bereich ihres Substrates. Daher postulieren Birtalan *et al.*, dass die Funktion der Chaperone nicht darin bestehen kann, ihre Substrate zu entfalten oder vor Aggregation zu schützen. Vielmehr könnte der Komplex aus Chaperon und Effektor ein dreidimensionales Sekretionssignal darstellen [15].

Eine weitere Funktion der Chaperone könnte darin bestehen, eine Hierarchie in der Yop-Sekretion aufzubauen, indem Effektoren mit einem Chaperon effektiver sekretiert werden als Effektoren ohne eigenes Chaperon [20, 173].

Chaperone besitzen aber auch Einfluss auf die Regulation der Expression der *Yersinia* Effektoren. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion von SycH, SycD und SycE mit YscM1 und YscM2, zwei negativen Regulatoren des T3SS. Solange YscM1 in der Bakterienzelle vorliegt, ist die Expression der Yops reprimiert. Nach dem Kontakt mit einer Wirtszelle kommt es zu einer rapiden Ausschleusung von YscM1/YscM2 aus der Bakterienzelle und die Transkription der Effektoren wird verstärkt [119, 27]. Vor allem die Überexpression von SycH führt zu einer erhöhten Sekretion von YscM1 und damit zu einer erhöhten Yop Expression [26].

1.4 Das Typ-III-Sekretionssystem

Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) sind hochkomplexe, multimere Proteintransportsysteme, die aufgrund ihrer Funktion und Morphologie auch als Injektisom oder Nadelkomplex bezeichnet werden. Auf der Oberfläche solch einer Yersinienzelle finden sich 50-100 solcher Nadelkomplexe [60].

1.4.1 Typ-III-Sekretionssysteme und ihre Verwandtschaft zu den Flagellen

Typ-III-Proteintransport findet man in Flagellen und in den Typ-III-Sekretionsapparaten mancher gram-negativer Bakterien (nicht-flagelläre T3SS, NF-T3SS). Beim Typ-III-abhängigen Proteintransport werden in einem ATP-abhängigen Prozess ungefaltete Proteine durch einen einzigen zusammenhängenden Proteinkanal über beide bakterielle Membranen transportiert. Daran sind mehr als zwanzig Proteine beteiligt, zu denen neben den Komponenten des Apparates selbst auch eine spezifische ATPase und mehrere Chaperone zählen. In *Yersinia* sind ungefähr 25 Proteine für die volle Funktionalität des T3SS nötig. In den Flagellen dient die T3-Sekretion der Assemblierung der distalen Komponenten, welche außerhalb der Zellmembran liegen. Bei den NF-T3SS dient der T3-Sekretionsapparat neben dem Aufbau des Apparates selbst auch der Translokation von Effektorproteinen in eukaryotische Zellen. Ein Kern von 9 Proteinen ist in allen 7 bekannten Familien von NF-T3SS konserviert - in *Yersinia* zählen dazu YscN, YscQ, YscJ, YscC, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV [56, 161]. Acht dieser Proteine besitzen wiederum Homologe im Flagellenapparat. Dazu gehören die ATPase (YscN), Proteine des Exportapparates (YscR, YscS, YscT, YscU, YscV), das putative C-Ring Protein (YscQ) und ein Protein der inneren Membranringe (YscJ). Das Secretin YscC kommt in Flagellen nicht vor. Die enge Verwandtschaft beider Systeme wird offensichtlich, wenn man ihre Morphologie vergleicht (Abb. 1.3).

Über die Frage, welches System sich zuerst entwickelte, gibt es geteilte Meinungen. Wegen der scheinbar basaleren Funktion der Motilität und der weiten phylogenetischen Verbreitung der Flagellen und der Eukaryoten-spezifischen Funktion der NF-T3SS gehen manche davon aus, dass die Flagellen das evolutionäre Vorläufersystem darstellen [161]. Gophna *et al.* postulieren jedoch auf der Basis von phylogenetischen Analysen, dass sich NF-T3SS und Flagellen aus einem gemeinsamen, primitiveren Vorläufersystem entwickelt haben [51].

1.4.2 Die Rolle der ATPase und die Protonen-motorische Kraft

Schon sehr früh wurde gezeigt, dass die Protonen-motorische Kraft (PMF, *proton motive force*) für die Assemblierung des Flagellenapparates nötig ist [10]. Dies konnte

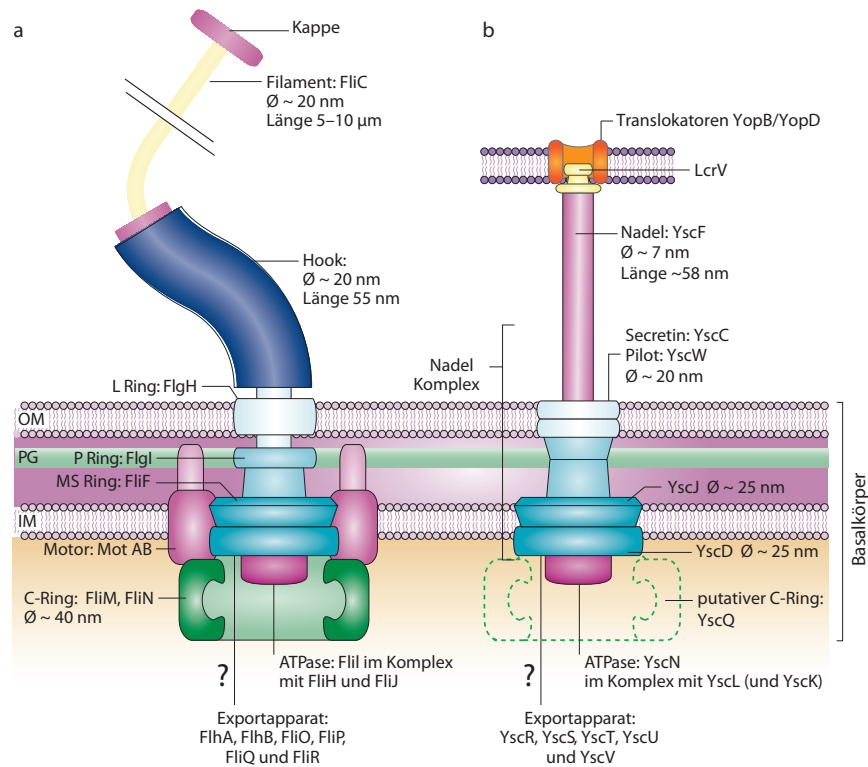


Abbildung 1.3: Vergleich der Strukturen des Flagellums und des Injektisoms

Schematischer Aufbau des (a) Flagellums und (b) des Injektisoms aus *Yersinia*. Die extrazellulären Komponenten des Flagellenfilamentes bzw. der T3-Nadel unterscheiden sich vollständig in Funktion und Aufbau. Das Sekretin YscC in der äußeren Membran hat kein Homolog im Flagellenapparat. Der zytosolische C-Ring ist im Injektisom als gestrichelte Linie dargestellt, da er experimentell noch nicht eindeutig nachgewiesen wurde. Der Exportapparat ist mit einem Fragezeichen versehen, da seine genaue Lokalisierung noch nicht geklärt ist. (adaptiert aus Cornelis (2006) [34])

OM - äußere Membran, PG - Peptidoglycan, IM - innere Membran

später durch andere Gruppen bestätigt und auf das T3SS von *Yersinia* übertragen werden [48, 174]. Später wurde jedoch für das Flagellen T3SS aus *Salmonella enterica* (*S. enterica*) die ATPase FliI identifiziert, welche ebenfalls für die Assemblierung des Flagellenapparates wichtig ist [42]. Weil katalytische FliI Mutanten keine Flagelline mehr transportieren, wurde ursprünglich angenommen, dass die freigesetzte Energie der ATP-Hydrolyse den Transport der T3-Substrate antreibt. Arbeiten von Minamino *et al.* zeigten jedoch, dass die Assemblierung der Flagellen in der Abwesenheit von FliI stattfinden kann, wenn sein negativer Regulator FliH ebenfalls deletiert ist [100]. Sie konnten außerdem frühere Ergebnisse dahingehend bestätigen, dass die PMF, unabhängig von der Anwesenheit von FliI und FliH, absolut essentiell für die Assemblierung ist.

Interaktionsstudien erbrachten, dass FliI und FliH an zwei Komponenten des Exportapparates binden - FlhA und FlhB [99]. Außerdem interagiert der FliI/FliH-Komplex mit Chaperon-Substrat-Komplexen [158]. Die T3SS ATPase InvC aus

S. enterica bindet ebenfalls an Chaperon-Substrat-Komplexe und katalysiert die Freisetzung des Effektors vom Chaperon und dessen Entfaltung [3].

Die ATPase des NF-T3SS in *Yersinia* ist YscN. Sie interagiert mit den bisher identifizierten Komponenten YscQ, YscK und YscL [67, 18]. YscL assoziiert im Zytosol mit YscN und inhibiert die ATPase-Aktivität. YscQ ist vermutlich die Komponente, welche den zytosolischen Ring (C-Ring) aufbaut (siehe Abschnitt 1.4.4.1). YscK konnte bisher keine genaue Funktion zugeschrieben werden. Möglicherweise fungiert es als generelles Chaperon. YscQ, YscK und YscL agieren wiederum mit Komponenten des T3SS Exportapparates [128].

Die genaue Natur all dieser Wechselwirkungen ist bisher nicht geklärt. Die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit legen aber nahe, dass der Typ-III-Sekretionsprozess sowohl die PMF als auch die ATPase Aktivität benötigt. Die PMF ist dabei vermutlich für den eigentlichen Translokationsprozess nötig, während der ATPase-Komplex wohl eher für die Rekrutierung der Substrate im Zytosol, das effektive Andocken an den Exportapparat, die Entfaltung und das initiale Einfädeln in den Translokationskanal verantwortlich ist [100].

1.4.3 Transportsignal

Eine der zentralen und bisher ungeklärten Fragestellungen bezüglich des T3SS ist die Frage nach der Natur des Transportsignales. Das liegt daran, dass die Substrate des T3SS keine einheitliche Signalsequenz besitzen [97]. Darum und aufgrund widersprüchlicher experimenteller Ergebnisse wird dieses Thema seit Jahren kontrovers diskutiert.

Zunächst sollten jedoch zwei grundlegende Begriffe definiert werden: Sekretion und Translokation. Der Begriff Sekretion bezeichnet den Export der T3SS-Substrate in das umliegende Milieu, z.B. in den Kulturüberstand. Der Begriff Translokation definiert hier den Transport der T3SS-Substrate vom Bakterienzytosol in das Wirtszellzytosol, über die bakteriellen Membranen und die eukaryotische Zellmembran.

Sicher ist bisher, dass die ersten 15-17 Aminosäuren bzw. Codons ausreichend sind, um eine T3-abhängige Sekretion zu vermitteln [150, 7]. Verschiedene *frame-shift* Mutationen in den ersten 15 Codons von YopQ, YopE und YopN aus *Y. enterocolitica*, die zu einer drastischen Änderung der Proteinsequenz führen, aber die Nukleotidsequenz relativ unverändert lassen, hatten keinen Effekt auf die Sekretion [7, 8]. Im Gegensatz dazu konnten synonyme Nukleotidsubstitutionen in den ersten 15 Codons der *yopQ*-mRNA identifiziert werden, die die Sekretion verhindern [125]. Dies legte die Vermutung nahe, dass das T3-Transportsignal in der mRNA-Sequenz kodiert ist. Lloyd *et al.*, die das Transportsignal von YopE aus *Y. pseudotuberculosis* in seiner mRNA und Proteinsequenz mutierten und auf Sekretionsfähigkeit analysierten, kamen allerdings zu dem Ergebnis, dass das T3SS bevorzugt amphipathische N-terminale Aminosäuresequenzen transportiert [89, 90]. Einige Yops, wie z.B. YopE,

YopH und YopD, besitzen außerdem neben dem Transportsignal ein zusätzliches Translokationssignal in den Aminosäuren 15-100, welches die Chaperon-Bindung vermittelt und für die Translokation, nicht aber die Sekretion, nötig ist [150, 168]. Cheng *et al.* konnten zeigen, dass YopE mit Translokationsdomäne nur in Anwesenheit seines Chaperons SycE durch das T3SS transportiert wird und dafür das Transportsignal nicht nötig ist [30]. Im Gegensatz dazu ist das Transportsignal für die Sekretion ausreichend, wenn die Translokationsdomäne deletiert wird. Möglicherweise wird durch die Chaperonbindung eine Hierarchie in der Translokation der Yops aufgebaut, so dass Yops mit einem Chaperon effektiver transloziert werden als Yops ohne Chaperon [20].

1.4.4 Aufbau und Assemblierung des T3SS

1.4.4.1 Basalkörper

Als Basalkörper wird das Injektisom ohne seine Nadelstruktur bezeichnet. Detaillierte Einblicke in seine Morphologie wurden durch die Visualisierung mithilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) erhalten (Abb. 1.4a und c). Aufnahmen des Injektisoms von *Salmonella* und *Shigella* zeigen, dass sich beide Komplexe morphologisch sehr ähnlich sind [95, 58].

Der Basalkörper besteht aus 2 Ringpaaren, die sich in der inneren und äußeren Membran befinden und durch einen durchgehenden Proteinkanal (*inner rod*) miteinander verbunden sind. Dieser besitzt einen inneren Durchmesser von ca. 2-3 nm und ist mit der Nadel strukturell gekoppelt (Abb. 1.4a, oberes Bild). Dieser Aufbau ermöglicht den Transport der T3-Substrate in einem Schritt über beide bakterielle Membranen.

Nur drei Proteine sind am Aufbau dieser Ringe beteiligt. Der Ring in der äußeren Membran besteht in *Yersinia* aus einem Oligomer des Proteins YscC, welches in allen NF-T3SS konserviert ist. Es gehört zur großen Familie der Sekretine, die in der äußeren Bakterienmembran Ringporen aus 12-14 Untereinheiten ausbilden und auch in anderen Transportsystemen, zB. dem Typ-II-Transportsystem, vorkommen [25, 78, 12]. Die Sekretine setzen sich aus einer Protease-resistenten C-terminalen Membrandomäne und einer N-terminalen periplasmatischen Domäne zusammen. Der korrekte Einbau von YscC bedarf der Assistenz des Proteins YscW [24].

In der inneren Membran befinden sich zwei Ringe, die in *Yersinia* aus den Proteinen YscJ und YscD aufgebaut sind. Arbeiten an den YscJ Homologen PrgK (*S. enterica*) und EscJ (*E. coli*) haben ergeben, dass sie eine Ringstruktur aus ca. 24 Untereinheiten auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran aufbauen und über eine C-terminale Transmembranhelix und einen N-terminalen Lipidrest in der inneren Membran verankert sind [178]. Der zweite Ring besteht aus YscD (PrgH in *S. ente-*

rica und EscD in *E. coli*), welches sich aus einer kleineren N-terminalen, zytoplasmatischen und einer großen C-terminalen, periplasmatischen Domäne zusammensetzt, die durch eine einzelne Transmembranhelix verbunden sind [151]. Vermutlich trägt vor allem der periplasmatische Teil von YscD/PrgH/EscD zur Ringbildung bei und umschließt den Ring aus YscJ/PrgK/EscJ. Arbeiten von Spreter *et al.* [151] haben gezeigt, dass über die periplasmatischen Domänen dieser 3 Proteine ein enger Kontakt zwischen den Strukturen der inneren und äußeren Membran aufgebaut wird. Für den oben erwähnten Kanal (*inner rod*), welcher im Inneren der Membranringe liegt und in die Nadelstruktur übergeht, konnte bisher nur in *S. enterica* ein putatives Protein, PrgJ, identifiziert werden [34]. Für die anderen T3SS ist bisher kein Protein bekannt, welches diese Struktur aufbauen könnte.

Weiterhin gibt es in Flagellen den sog. C-Ring (cytosolischen Ring), bestehend aus FliN und FliM, welcher mit den Ringen der inneren Membran assoziiert ist (Abb. 1.3). Dieser C-Ring konnte bisher nur in aufgereinigten Flagellen nachgewiesen werden, vermutlich weil er in NF-T3SS während der Aufreinigung vom T3S-Apparat abdissoziiert [94]. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten vermutet man aber, dass Proteine der YscQ-Familie diesen Ring in NF-T3SS aufbauen [34]. Hinweise dafür existieren auch aus Interaktionsstudien. Das YscQ Homolog aus Shigellen, Spa33, ist an der zytoplasmatischen Seite des Basalkörpers lokalisiert und interagiert mit MxiG und MxiJ, den beiden Komponenten, welche die inneren Membranringe aufbauen. Außerdem interagiert Spa33 mit der ATPase des T3SS, Spa47 [104]. In *Yersinia* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das putative C-Ring Protein YscQ mit der ATPase des T3SS wechselwirkt [67]. Möglicherweise fungiert der C-Ring als Plattform für die initiale Rekrutierung zytoplasmatischer Komponenten, wie z.B. der ATPase.

1.4.4.2 Nadel und Nadelspitze

Den Abschluß des Injektisoms bildet eine Nadelstruktur, die aus der Bakterienoberfläche herausragt und den extrazellulären Teil des Translokationskanals bildet [80]. Sie wird durch die helikale Assemblierung eines kleinen Nadelproteins aufgebaut und umschließt im Inneren einen Hohlzylinder. Obwohl das Nadelprotein des NF-T3SS viel kleiner ist (ca. 9 kDa) und keine Sequenzähnlichkeit zu den Proteinen des Flagellenfilamentes aufweist, besitzen beide Komponenten eine sehr ähnliche helikale Struktur [33]. In *Yersinia* wird die Nadel von YscF aufgebaut und besitzt eine Länge von 60 nm \pm 10 nm mit einem hohlen Zentrum von 2-3 nm [60]. Die Nadel ist in ihrer Länge streng reguliert, um zu gewährleisten, dass sie das LPS und die Distanz zur Wirtszelloberfläche überbrückt [70, 105, 171].

Die T3-Nadelspitze wird durch einen pentameren Proteinkomplex abgeschlossen, der in *Yersinia* aus dem Protein LcrV besteht (Abb. 1.4b) [106]. Auf Sequenzebene sind die Nadelspitzenproteine der verschiedenen T3SS nicht konserviert. Die Kristallstrukturen für LcrV [36], IpaD (*Shigella*) [68] und EspA (*Escherichia*) [178] ha-

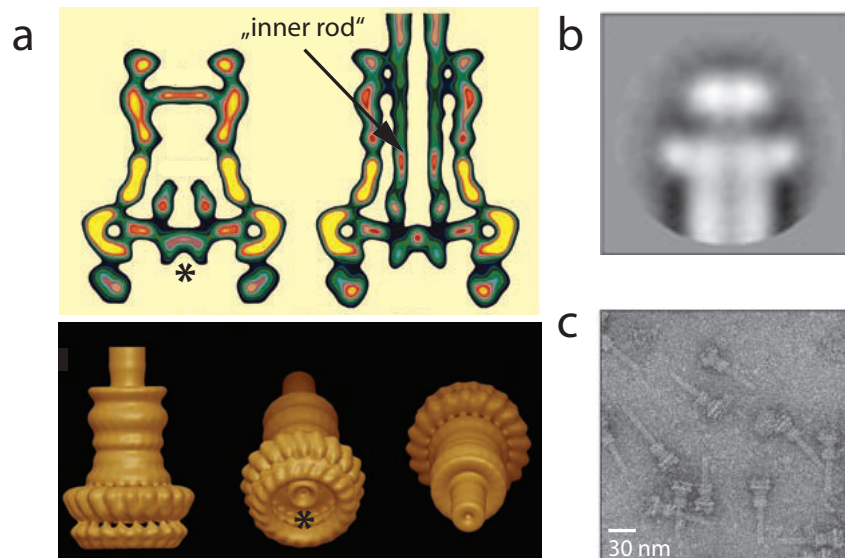


Abbildung 1.4: Morphologie und Komponenten des T3SS

(a) EM-Oberflächenberechnungen (unten) und die aufgeschnittene Längsansicht (oben) des T3SS aus *Salmonella Typhimurium* zeigen die Unterteilung in die Ringe der inneren und äußeren Membran und die Nadel. Ein Proteinkanal (*inner rod*) verbindet die Basis des Basalkörpers mit der Nadel. Der Stern kennzeichnet die putative Struktur des Exportapparates [95]. (b) TEM-Aufnahme des *Y. enterocolitica* Nadelspitzenkomplexes, bestehend aus einem LcrV Pentamer [22]. (c) EM-Aufnahme aufgereinigter T3SS aus *Salmonella Typhimurium* [95].

ben aber gezeigt, dass sie strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Die T3-Nadelspitze dient vermutlich als Grundgerüst für die Assemblierung und Membraninsertion der Translokatorproteine und ist somit in den Translokationsprozess der Effektorproteine involviert [118, 165]. Außerdem diskutiert man, dass Nadel und Nadelspitze an der Erkennung und Signalweiterleitung des Wirtszellkontaktes an die Basis des T3-Apparates beteiligt sind, der genaue Mechanismus ist aber noch unklar [165].

1.4.4.3 Translokatoren YopB und YopD

Die Translokatorproteine YopB und YopD besitzen hydrophobe Domänen, über die sie in Membranen inserieren und Poren ausbilden können [52, 156]. Diese Porenbildung ist essentiell für die Virulenz von *Yersinia*, da ohne die Translokatorproteine YopB/D keine Translokation von Effektoren in die Wirtszellen stattfindet [116, 53]. Außerdem konnte sowohl für YopB als auch für YopD gezeigt werden, dass sie an LcrV, das Nadelspitzenprotein binden [138]. Es wird angenommen, dass YopB/D, über die Interaktion mit LcrV, die Andockstelle für die T3-Nadel bilden und somit die Verbindung des Translokationskanals mit der Wirtszelle herstellen und durch die YopB/D Pore die Translokation der Effektoren in die Wirtszellen stattfindet [53].

1.4.4.4 Exportapparat

Wie bereits in Abschnitt 1.4.1 erwähnt, gibt es 8 Proteine, die in allen T3SS und in Flagellen hoch konserviert sind. Fünf dieser Proteine (YscR, YscS, YscT, YscU und YscV) und deren Homologe in Flagellen (FliP, FliQ, FliR, FlhB und FlhA) bilden den Exportapparat [43, 99].

Elektronenmikroskopische (EM) Rekonstruktionen des T3S-Apparates aus *Salmonella* Typhimurium offenbarten, dass im Zentrum der inneren Membranringe eine Becher-förmige Auswölbung zur cytoplasmatischen Seite des T3SS hinausragt (Abb. 1.4a, Stern). Diese Struktur könnte aus den Proteinen des Exportapparates bestehen bzw. die Andockstelle für sie sein [95, 2]. In EM-Aufnahmen von Flagellen aus *Salmonella* Typhimurium konnte die gleiche Struktur identifiziert werden [74].

Interaktionsstudien mit Komponenten des Exportapparates aus Flagellen [99, 98, 179], dem *E. coli* T3SS [35] und dem *Yersinia* T3SS [128, 67] haben gezeigt, dass vielfältige Wechselwirkungen zwischen ihnen, dem Protein des C-Rings und dem ATPase Komplex bestehen. Über YscR, YscS und YscT ist bisher nichts bekannt. YscV wird in einem eigenen Abschnitt diskutiert (Abschn. 1.5).

Für YscU und sein Flagellenhomolog FlhB hat man die Funktion charakterisieren können. Beide Proteine sind ein Substratklassen-Schalter im Assemblierungsprozess. YscU besteht aus einer N-terminalen Transmembrandomäne und einer großen cytoplasmatischen Domäne, die in einem konservierten NPTH-Motif autoproteolytisch gespalten wird. Mutationen in diesem Motif führen dazu, dass YscU nicht mehr gespalten werden kann [83]. Diese Mutanten können zwar noch Effektoren exportieren, aber nicht mehr LcrV und die Translokatoren YopB/D [149]. Außerdem identifizierten Riordan *et al.* [128] anhand von YscU Mutanten, die Substrate, welche vor bzw. nach der Autoproteolyse mit YscU interagieren. Sie stellten folgendes Modell auf. Ungespaltenes YscU interagiert mit YscO. YscO rekrutiert YscP, welches für die Assemblierung einer Nadel mit korrekter Länge wichtig ist. Nach Fertigstellung der Nadel kommt es zur Sekretion von YscO und YscP, was zur Spaltung von YscU führt. Gespaltenes YscU interagiert nun mit dem ATPase Komplex, welcher wiederum für die Rekrutierung und Sekretion der mittleren und späten Substrate (LcrV, Translokatoren YopB/D und Effektoren) im Zytosol wichtig ist. Für andere Komponenten des Exportapparates konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie mit dem ATPase Komplex interagieren. Der Exportapparat fungiert daher vermutlich als Andockstelle für ATPase-Substratkomplexe. Außerdem ist er ein wichtiger Regulator im Prozess der T3SS Assemblierung, indem er eine Hierarchie im Export der Substrate aufbaut und kontrolliert. Zusätzlich sind einige der Komponenten vermutlich am Aufbau des Exportkanals in der inneren Membran beteiligt.

1.4.4.5 Assemblierung

Die Assemblierung der Flagellen erfolgt in einem linearen Prozess vom proximalen (innen) zum distalen (außen) Teil des Apparates: zuerst die Komponenten der inneren Membran und der C-Ring, dann die Komponenten im Periplasma und der äußeren Membran und abschließend das Filament [94]. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Flagellum und T3SS wurde für das letztere ein ähnlicher Mechanismus angenommen. Analysen von Diepold *et al.* in *Yersinia* zeigen jedoch, dass die Assemblierung des T3SS in einer anderen Reihenfolge stattfindet [37].

Zuerst assembliert der Sekretin-Ring, bestehend aus YscC, in der äußeren Membran. Dazu benötigt YscC lediglich die Assistenz seines Pilotproteins YscW.

Anschließend erfolgt die Assemblierung von YscD und YscJ, der beiden Komponenten, welche die Ringe in der inneren Membran aufbauen. YscD stellt dabei über YscC und YscJ den Kontakt zwischen äußerer und innerer Membran her.

Der C-Ring (YscQ) wird nur in Anwesenheit aller 3 Membranringe und des ATPase Komplexes YscN/YscK/YscL assembliert. Ebenso assembliert der ATPase Komplex nur in Anwesenheit von YscQ. Die Komponenten des Exportapparates (YscR, YscS, YscT, YscU, YscV) scheinen zwar die Assemblierung von YscQ zu stabilisieren, sie sind aber weder für YscQ noch für die ATPase essentiell. Zum Schluß erfolgt die Assemblierung der Nadel und die Sekretion der Effektoren. Diese experimentell ermittelte Reihenfolge der Assemblierung ist in Abbildung 1.5 noch einmal schematisch dargestellt.

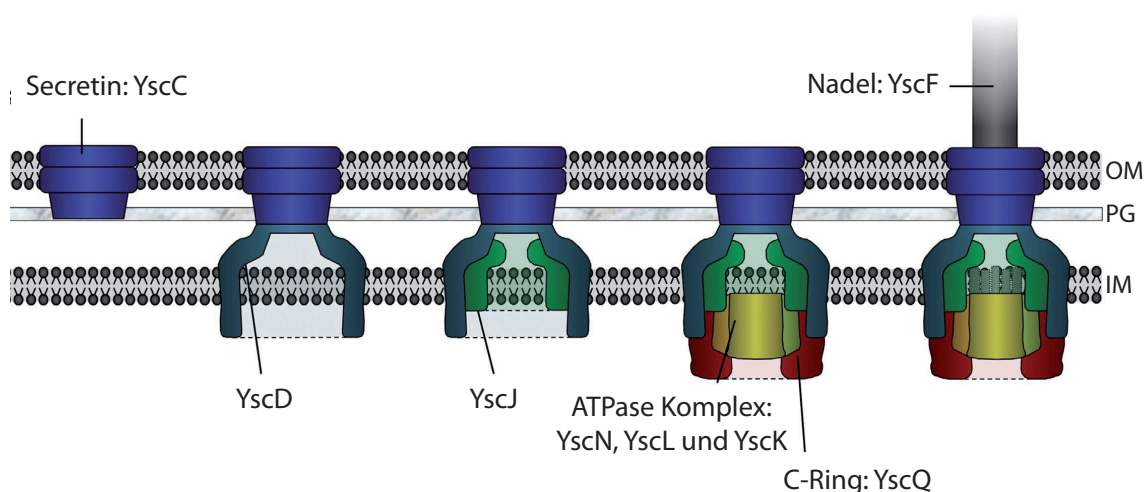


Abbildung 1.5: Assemblierung des T3SS von *Y. enterocolitica*

Die Assemblierung des T3SS beginnt mit dem Sekretin YscC (äußere Membran), danach folgt die Assemblierung von YscD und YscJ (innere Membran). Die anschließende Assemblierung des ATPase Komplexes und des C-Ringes erfolgt gleichzeitig und in gegenseitiger Abhängigkeit. Abgeschlossen wird die Assemblierung mit der Polymerisation des Nadelproteins YscF. In welchem Stadium der Exportapparat eingebaut wird, ist unklar. (adaptiert aus Diepold *et al.* [37])

OM-äußere Membran, PG-Peptidoglycan, IM-innere Membran

1.5 YscV - eine Komponente des Exportapparates

Wie bereits in Abschnitt 1.4.4.4 erwähnt, ist YscV (früher LcrD, engl. *low-calcium-response*) eine Komponente des hochkonservierten Exportapparates. Mit einer Länge von 704 Aminosäuren (ca. 77kDa) ist es auch das mit Abstand größte Protein des Exportapparates. Das Gen *yscV* bildet mit *lcrR* ein gemeinsames Operon und der Translationsstop von *yscV* und der Translationsstart von *lcrR* überlappen um einige Nukleotide [11]. YscV gliedert sich in eine N-terminale Transmembrandomäne, bestehend aus vermutlich 8 Transmembranhelices, und eine große C-terminale zytoplasmatische Domäne, welche ungefähr die Aminosäuren 320-704 (YscV_c) umfasst [122, 94, 13].

Diverse *in-frame* Deletionen in YscV zeigten, dass es sowohl für die Sekretion von LcrV und den Yops als auch für eine maximale Transkription mehrerer Operone (*lcrGVHyopBD*, *yopM*, *yscBCDEF*) benötigt wird [123]. Interaktionsstudien des YscV Homologen in Flagellen, FlhA, zeigten, dass FlhA vielfältige Wechselwirkungen eingeht [99, 179]. Zum einen interagiert es vermutlich mit sich selbst und mit FlhB, dem Homolog von YscU und Komponente des Exportapparates. Außerdem interagiert es mit Substraten des T3SS und dem ATPase Komplex FliI-FliH-FliJ, für den postuliert wird, dass er T3-Substrate im Zytosol rekrutiert, dem T3SS zur Translokation zuführt und einen Teil der Energie für den Translokationsprozess bereitstellt (siehe Abschn. 1.4.2).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Typ-III-Sekretionssysteme sind hochkomplexe Proteintransportmaschinen, welche sich über beide bakterielle Membranen erstrecken und aus mehr als 20 Proteinkomponenten aufgebaut sind.

Sie kommen außer in pathogenen Yersinienspezies auch in zahlreichen anderen tier- und pflanzenpathogenen gram-negativen Bakterien vor und sind dort essentielle Grundlage für die Ausprägung der Virulenz. Ihre Komplexität ist ein Grund, warum viele Aspekte ihres Aufbaus, ihrer Funktion und ihres Transportmechanismus noch nicht verstanden sind.

YscV ist ein Bestandteil des Exportapparates, welcher die eigentliche Transportmaschine des T3SS ist. Die Funktionalität von YscV ist essentiell für die Funktionalität des gesamten T3SS. Die aktuelle Hypothese zur Funktion von YscV geht davon aus, dass es gemeinsam mit YscU, einer weiteren Komponente des Exportapparates, als Andockstelle für die Substrate des T3SS fungiert und deren anschließende Einschleusung in den Translokationskanal bewerkstelligt. Diese Annahmen stammen aus Experimenten an den Homologen FlhA und FlhB des Flagellenapparates aus *S. enterica*.

Bis auf Topologieanalysen und der Charakterisierung von YscV-Mutantenphänotypen gibt es bisher keine weiterführenden Untersuchungen zur Rolle von YscV im Sekretionsprozess.

Diese Arbeit hatte daher zwei sehr grundlegende Zielstellungen:

- (1) Aufklärung der Struktur und Charakterisierung des Oligomersierungsverhaltens der zytoplasmatischen Domäne YscV_c.
- (2) Identifizierung von anderen Komponenten des T3SS bzw. T3S-Substraten, welche mit YscV interagieren.

Damit sollte eine bessere Vorstellung darüber erlangt werden, mit welcher Stöchiometrie YscV im Apparat vorliegt und, daraus abgeleitet, wie es strukturell in den T3S-Apparat eingebunden ist. Mit der Identifizierung von Interaktionspartnern sollte ein besseres Verständnis der Funktion von YscV im Sekretionsprozess gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Software

Software Programme, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Software Programme

Software	Anwendung	Hersteller
TEXmaker 2.1	LaTeX Editor zur Erstellung großer Textdokumente	Freeware, Autor Pascal Brachet
Adobe Photoshop CS4	Erstellen und Bearbeiten von Bildern	Adobe Systems Inc. USA
Adobe Illustrator CS4	Erstellen und Bearbeiten von Bildern	Adobe Systems Inc. USA
CloneManager Professional 9	Sequenz Manipulation, Analyse und Alignment, Primer Design	Sci Ed Software, USA
MASCOT	Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie Daten	Freeware [114]
Phyre Version 0.2	Datenbank-gestützte, Homologie-basierte Vorhersage von Protein 3D-Modellen	Freeware [75]
SignalP Version 3.0	Vorhersage von Signalpeptiden	Freeware [38]
ClustalW	Sequenz-Alignment-Programm für DNA und Proteinsequenzen	Freeware, EMBL-EBI ¹
SVMtop	Vorhersage von Membrantopologie von Proteinen	Freeware [91]
TMHMM	Vorhersage von Membrantopologie von Proteinen	Freeware [79]
Phobius	Vorhersage von Membrantopologie und Signalpeptiden von Proteinen	Freeware [71]
TopPred II	Vorhersage von Membrantopologie von Proteinen	Freeware [32]
Hydrophobizitätsplot nach Kyte und Doolittle	Hydrophobizitätsanalyse von Proteinen	Freeware [81]
PSIPRED	Vorhersage von Proteinsekundärstrukturen	Freeware [69]

¹European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute

2.2 Vektoren und Plasmide

Alle verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet und hergestellt wurden sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pWS	Expressionsvektor, <i>Ptac</i> -Promotor, <i>lacI</i> ^a -Repressor, Amp ^r	[92]
pMAL-c2x	Expression von N-terminalen MBP-Fusionsproteinen, <i>Ptac</i> , <i>lacI</i> , Amp ^r	New England Biolabs

Tabelle 2.3: Verwendete rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pYscVHis	pWS Derivat, exprimiert YscV mit C-terminalem RGS-8xHis-Tag	diese Arbeit
pHisYscV _{c326}	pWS Derivat, exprimiert die cytoplasmatische Domäne von YscV (Aminosäuren 326-704) aus <i>Y. enterocolitica</i> WA-314 mit N-terminalem 8xHis-Tag und TEV-Schnittstelle	diese Arbeit
pHisYscV _{c378}	pWS Derivat, exprimiert verkürzte cytoplasmatische Domäne von YscV (Aminosäuren 378-704) aus <i>Y. enterocolitica</i> WA-314 mit N-terminalem 8xHis-Tag und TEV-Schnittstelle	diese Arbeit
pMBPYscV _{c326}	pMAL-c2x Derivat, exprimiert die cytoplasmatische Domäne von YscV (Aminosäuren 326-704) aus <i>Y. enterocolitica</i> WA-314 mit N-terminaler MBP-Fusion	diese Arbeit
pMBPYscV _{c378}	pMAL-c2x Derivat, exprimiert die verkürzte cytoplasmatische Domäne von YscV (Aminosäuren 326-704) aus <i>Y. enterocolitica</i> WA-314 mit N-terminaler MBP-Fusion	diese Arbeit
pG-KJE-8	exprimiert DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES Chaperone aus <i>E. coli</i> K-12 W3110 unter dem <i>araB</i> bzw. <i>Pzt-1</i> Promotor, Cm ^r	[111]

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Sie wurden RP-HPLC-gereinigt von Thermo Fisher Scientific bezogen. Die Oligonukleotide wurden als Stammlösung mit 5 pmol/μl bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide

die unterstrichenen Oligonukleotidsequenzen kennzeichnen die eingefügten Restriktionschnittstellen

Name	Sequenz 5'-3'	Enzym	Bemerkung
YscV _{c378} -for	ATCATATGCATCATCACCATCAC CATCACCATGAAAACCTGTACT TCCAAGGAGATTCAAGCCAACAG GAAGCACTGGAAG	NdeI	verkürzter <i>YscV</i> C-Terminus in pWS 8xHis-TEV, forward
YscV _{c326} -for	ATCATATGCATCATCACCATCACC ATCACCATGAAAACCTGTACTT CCAAGGACGTAATGACGAAGCTAA TCAAGACCTG	NdeI	vollständiger <i>YscV</i> C-Terminus in pWS 8xHis-TEV, forward
YscV _c -rev	ATGTCGACTCATAAGCAAACCTCGTCC AAGTGG	SalI	vollständiger <i>YscV</i> C-Terminus in pWS revers
MBPYscV _{c378} -for	TAGAATTTCGATTCAAGCCAACAGGAA GCACTGGAAG	EcoRI	MBP-YscV _{c326} forward
MBPYscV _{c326} -for	TAGAATTCCGTAATGACGAAGCTAAT CAAGACCTG	EcoRI	MBP-YscV _{c378} forward
MBPYscV _c -rev	ATGTCGACTCATAAGCAAACCTCGTCC AAGTGG	SalI	MBP-YscV _c revers
pWSYscVhis-for	ATCACATATGAATCCCCATGATCTTGA GTGGC	NdeI	YscV in pWS, forward
pWSYscVHis-rev	TGTAGTCGACTCAATGGTGATGGTG ATGGTGATGATGAGAACCACGTAA GCAAACCTCGTCCAAGTGTTG	SalI	YscV in pWS RGS-8xHis, revers

2.4 Bakterienstämme

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) Stämme aufgeführt. Alle Stämme wurden als Glycerolkulturen bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.5: Verwendete *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämme

Stamm	Kurzbeschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	Klonierungsstamm, F'[<i>lacI^q</i> Tn10(<i>tetR</i>)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ -	Invitrogen [®]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Expressionsstamm, F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm ^r	Invitrogen [®]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Expressionsstamm, F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen [®]
<i>Y. enterocolitica</i> WA-314	Laborstamm, Biotyp 1B, Serotyp O:8, Nal ^r	[57]

2.5 Medien

2.5.1 Medien

Die Sterilisation der verwendeten Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C, 1 bar für 15 Minuten. Für die Herstellung von Festmedium wurden 1.5 % (w/v) Agar zugesetzt. Glucose und Antibiotika (steril filtriert) wurden nach dem Autoklavieren dem Medium zugegeben. Die Anzucht von *Y. enterocolitica* und *E. coli* erfolgte in LB-Medium. Als Transformationsmedium wurde reichhaltiges SOC-Medium verwendet.

Luria-Bertani(LB)-Medium

- 1 % Trypton
- 0.5 % Hefeextrakt
- 0.5 % Natriumchlorid
- pH 7.6

SOC-Medium

- 2 % Trypton
- 0.5 % Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl

10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 20 mM Glucose
 pH 7.2

2.5.2 Antibiotika und Medienzusätze

Die verwendeten Antibiotika bzw. Medienzusätze wurden als Stammlösung hergestellt, steril filtriert und bei -20°C bzw. $+8^\circ\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2.6: Antibiotika und Medienzusätze

(²subinhibitorische Konzentration zur Induktion von *Ptz-1*-Promotoren)

	Stammkonzentration	Endkonzentration
Antibiotika		
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Carbenicillin (Carb)	250 mg/ml	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml	20 ng/ml ²
Medienzusätze		
EGTA	500 mM	5 mM
CaCl_2	1 M	1 mM, 0.2 mM
IPTG	1 M	0.1-1 mM
Glucose	20 %	0.2 %, 1 %

2.6 Kultivierung und Stammhaltung

2.6.1 Kultivierung

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C , die Anzucht von *Y. enterocolitica* erfolgte aerob bei 27°C entweder auf Festmedium oder in Flüssigkultur bei 150-200 rpm. Je nach Bedarf erfolgte die Zugabe von Antibiotika oder anderen Zusätzen (Tab.2.6).

2.6.2 Stammhaltung

Die Stämme wurden für maximal 4 Wochen bei 8°C auf Festmedium gelagert. Expressionsstämme wurden für jede Anzucht frisch transformiert und für maximal 1 Woche bei 8°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden 20 % Glycerolkulturen aus Übernachtskulturen angelegt und bei -80°C eingefroren.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA bis zu einer Menge von 20 µg (Minipräparation) wurde das Plasmid Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparation von Plasmid-DNA bis zu einer Menge von 100-200 µg (Midipräparation) wurde mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die DNA wurde in aqua_{bidest} eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Gewinnung von Bakterien-Schnelllysaten

Für die schnelle Gewinnung von Gesamt-Zelllysaten wurde eine Bakterien - Kolonie in 50 µl aqua_{bidest} eingerieben und für 10 min. bei 95 °C gekocht. Das Lysat wurde anschließend für 10 min. bei 10.000 xg zentrifugiert und als Template für die PCR eingesetzt.

2.7.3 DNA-Fällung

Zur Konzentrierung wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M) und 2 Volumen Ethanol (reinst) versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Fällung wurde für 10 min. bei 20.000xg zentrifugiert und das DNA-Pellet 2x in 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in einem entsprechenden Volumen aqua_{bidest} aufgenommen.

2.7.4 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm mit einer 1:50 bzw. 1:100 Verdünnung gegen aqua_{bidest} als Referenz. Um die Verunreinigung der Präparation mit Proteinen bewerten zu können, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Ein Quotient von $OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1.8$ steht dabei für eine gute Qualität der DNA-Präparation.

2.7.5 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR diente der Vervielfältigung bzw. dem Nachweis von DNA-Bereichen und transformierten Plasmiden. Als Template dienten entweder Bakterien-Schnelllysate oder Plasmidpräparationen. Es wurden ca. 50 ng Plasmid-DNA und 3-5 µl Bakterienlysate pro PCR-Ansatz eingesetzt. Es wurden zwei Amplifikationssysteme verwendet: der HotStart Master Mix (Qiagen), mit einer Taq-Polymerase ohne 3'-5'-

Exonukleaseaktivität, und das FastStart High Fidelity PCR System (Roche Biochemicals), mit einem Mix aus Taq-Polymerase und einem Protein mit Exonukleaseaktivität.

HotStart Master Mix:

Template	3 µl Bakterienlysats bzw. 50 ng Plasmid-DNA
Master Mix	5 µl
Oligonukleotid 1 (5 pmol/µl)	1 µl
Oligonukleotid 2 (5 pmol/µl)	1 µl
aqua _{bidest}	ad 10 µl

HotStart High Fidelity:

Template	5 µl Bakterienlysats bzw. 50 ng Plasmid-DNA
10xPuffer mit bzw. ohne MgCl ₂	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Oligonukleotid 1 (5 pmol/µl)	5 µl
Oligonukleotid 2 (5 pmol/µl)	5 µl
Polymerase	1 µl
aqua _{bidest}	ad 50 µl

Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Programm:

1	Anfangsdenaturierung	95°C, 15 min. HotStart Taq/95°C, 2 min. High Fidelity Taq
2	Denaturierung	95°C, 30 s
3	Anlagerung	T _m - (0-5°C), 30 s
4	Elongation	72°C, 1 min./2 kb HotStart Taq bzw. 1 min./1 kb High Fidelity Taq
5	finale Elongation	72°C, 7 min.
6	Kühlung	4°C

2.7.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers und 100-200 ng präparierter Plasmid-DNA pro Ansatz durchgeführt. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit folgendem Programm: 96°C, 1 min., 25x (96°C für 10 s, 50°C für 5 s, 60°C für 4 min.). Anschließend erfolgte die Analyse der Sequenzierung mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Amersham).

2.7.7 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in 0.7-1.5 %-igem Agarosegel mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer. Für die Detektion der DNA-Banden unter

UV-Bestrahlung wurden die Gele anschließend für 20 min. im Ethidiumbromid-Bad gefärbt (0.5 µg/ml Ethidiumbromid in aqua_{bidest}). Als DNA-Marker diente die 1kb Plus DNA Ladder von Invitrogen®.

TBE-Puffer

40 mM Tris
40 mM Borsäure
1 mM EDTA]

2.7.8 DNA-Isolierung aus dem Agarosegel

Für die Isolierung von elektrophoretisch getrennter DNA aus dem Agarosegel wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde je nach abgeschätzter DNA-Menge in 20-50 µl aqua_{bidest} eluiert.

2.7.9 Enzymatische Modifizierung von DNA

2.7.9.1 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Fermentas) durchgeführt. Für analytische Restriktionen wurden 20 µl Ansätze mit ca. 100 ng Plasmid-DNA verwendet. Präparative Restriktionen wurden in einem 50 µl Ansatz mit ca. 1 µg Plasmid-DNA bzw. Amplifikat durchgeführt. Der Verdau erfolgte für 2 h bei 37°C im Heizblock. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme entweder für 20 min. bei 65°C bzw. 80°C inaktiviert oder die geschnittenen DNA-Fragmente bei Bedarf zunächst dephosphoryliert (Abschn.2.7.9.2). Der Verdau wurde im Agarosegel überprüft und wenn nötig entsprechende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abschn.2.7.8).

2.7.9.2 Dephosphorylierung

Um die Religation von linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurden pro 50 µl Restriktionsansatz 1U Schrimp Alkalische Phosphatase (USB®) zugegeben und für 45 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min. bei 65°C inaktiviert.

2.7.9.3 Ligation

Für die Ligation linearer DNA-Fragmente wurden ca. 50 ng Vektor-DNA mit einem 3-10 fachen molaren Überschuß der Insert-DNA versetzt und in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 1 U T4 DNA Ligase (USB®) über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ansatz wurde entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder für 15 min. bei 65°C inaktiviert und anschließend bei -20°C eingefroren.

2.7.10 Transformation von DNA

2.7.10.1 Herstellung elektrokompetenter *Y. enterocolitica*

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 50 ml einer *Yersinia* Kultur 1:100 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 27°C bis zu einer $OD_{600} = 0.5-0.7$ angezogen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C und mit sterilen, vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 min. bei 8000 xg geerntet. Das Zellpellet wurde 2x in 20 ml aqua_{bidest} und 2x in 6 ml 10 %-igem Glycerol gewaschen und jeweils für 10 min. bei 8000 xg zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 300-500 µl 10 %-igem Glycerol aufgenommen und in Aliquots à 40 µl bei -80°C eingefroren oder direkt für die Elektroporation eingesetzt.

2.7.10.2 Elektroporation von *Y. enterocolitica*

Für die Elektroporation wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit 50-200 µg Plasmid-DNA gemischt und für 10 min. auf Eis präinkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser II BIO-RAD bei 1.2 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zellen wurden sofort auf Eis überführt und in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Die Yersinien wurden für 45 min. bei 27°C und 350 rpm inkubiert und anschließend auf einem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 27°C selektioniert.

2.7.10.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden kommerzielle, chemisch kompetente *E. coli* Top10 und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS von Invitrogen® verwendet. Für die Transformation wurden jeweils 1 Aliquot Bakterien mit 50-200 µg Plasmid-DNA gemischt und für 10 min. auf Eis präinkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C und eine anschließende Inkubation für 2 min. auf Eis. Die Bakterien wurden in 250 µl SOC-Medium aufgenommen und für 30 min. bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 37°C selektioniert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Quantitative Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in Lösung wurde der BIO-RAD Protein Assay verwendet. Der Assay basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie®-G250, wenn es an Proteine, speziell basische und aromatische Aminosäuren, bindet. Hierfür wurden 1-5 µl der Probe mit aqua_{bidest} auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Reagenz-Konzentrat versetzt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach 2 min. Reaktionszeit bei OD_{595nm} .

2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.8.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE nach Lämmli [82] werden Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür müssen sie vollständig denaturiert vorliegen. Hierfür werden Sodium-Dodecylsulfat (SDS), β -Mercaptoethanol (β -ME) und Dithiothreitol (DTT) zum Probenpuffer zugegeben. (β -ME) und DTT zerstören die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine, indem sie Disulfidbrücken lösen. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches sich an Proteine anlagert und nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört. Da seine Anlagerung an Proteine sehr regelmäßig erfolgt, verhält sich die Menge der gebundenen Ladung näherungsweise proportional zur Größe des Proteins. Die Auftrennung der Proteine erfolgt daher nach ihrem Molekulargewicht.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini Protean[®] 3 Cell (BIO-RAD). Als Laufpuffer diente SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1 % SDS). Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem 6-15 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel (Tab. 2.7). Die Proteinproben wurden in denaturierendem Lämmli-Puffer (2.5 ml Tris pH 8.8, 0.5 ml Glycerin, 1 ml β -ME, 4 ml 10 %-iges SDS, 0.005 % Bromphenolblau, add. 10 ml aqua_{bidest}) gelöst und für 2 min. bei 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandards dienten PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder und Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas), High-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare) und ColorPlus Prestained Protein Marker (New England Biolabs).

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Sammel-/Trenngele für die SDS-PAGE
(der Ansatz ist für 2 Gele à 10x15 cm ausreichend)

	Sammelgel		Trenngele	
	4 %	6 %	12 %	15 %
aqua _{bidest}	2.71 ml	3.81 ml	1.8 ml	0.81 ml
0.5 M Tris pH 6.8	1.25 ml			
1 M Tris pH 8.8		3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Rotiphorese 30 (Sigma-Aldrich)	0.7 ml	2 ml	4.05 ml	5 ml
10 % SDS	100 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
10 % TEMED	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
10 % APS	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l
Auflösungsbereich in kDa		ca. 60->200	ca. 20-60	ca. 10-40

2.8.2.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Bei der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine nach ihrem individuellen Masse-/Ladungsverhältniss aufgetrennt. Unter diesen Umständen kann man Oligomerisierungen und Proteinwechselwirkungen darstellen. Alle denaturierenden

Substanzen, wie SDS, DTT, β -ME, werden daher weggelassen. Ein Sammelgel wie in der SDS-PAGE ist ebenfalls nicht nötig. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90 min. bei 80 V auf Eis.

6 % NativPAGE Gel

25 mM HEPES
5 mM NaCl
6 % Rotiphorese 30 (Sigma-Aldrich)
0.2 % TEMED
0.04 % APS
pH 7.4

NativPAGE Laufpuffer

25 mM HEPES
5 mM NaCl
pH 7.4
vorgekühlt

NativPAGE Probenpuffer

25 mM HEPES
5 mM NaCl
10 % Glycerol
0.005 % Bromphenolblau
pH 7.4

2.8.2.3 Die *BlueNative*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die *BlueNative*-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein natives PAGE-System, welches von Schägger und von Jagow (1991) entwickelt wurde [140]. Es nutzt Coomassie[®]-G250 als negativen Ladungsträger. Anders als SDS beeinflusst Coomassie[®]-G250 aber nicht den nativen Zustand der Proteine, weshalb mit dieser Methode die Größen nativer Proteine und Proteinkomplexe bestimmt werden können. Da jedoch die Konformationen nativer Proteine extrem variieren, kann das geschätzte Molekulargewicht bis zu 15 % vom tatsächlichen Molekulargewicht des Proteins bzw. des Proteinkomplexes abweichen. Die BN-PAGE wurde mit dem NativePAGE[™]Novex[®] Bis-Tris Gel System (Invitrogen[®]) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mit NativePAGE[™]Novex[®] 4-16 % Bis-Tris Gelen (Invitrogen[®]). Als Molekulargewichtsstandard diente der NativeMark[™] Unstained Protein Standard (Invitrogen[®]), der eine Größenabschätzung im Bereich von 20-1200 kDa erlaubt.

2.8.3 Detektion von Proteinen

2.8.3.1 Färbung von Proteinen mit Coomassie®-R250

Für die Färbung von Proteinen mit Coomassie®-R250 wurden die Polyacrylamid-gele nach der Elektrophorese (Abschn.2.8.2.1) für 20-30 min. in einer Coomassie®-R250-Färbelösung geschwenkt. Anschließend folgte für 20 min. die Inkubation in Fixierungslösung und die Entfärbung des Gels über Nacht in aqua_{bidest}.

Färbelösung:

- 10 % Essigsäure
- 25 % Isopropanol
- 0.1 % Coomassie®-R250

Fixierungslösung:

- 10 % Essigsäure
- 40 % Methanol

2.8.3.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen im *Western Blot*

Beim Western Blot wird ein Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose oder PVDF Membran transferiert (*blotting*). Die Membran wird anschließend mit einem primären Antikörper inkubiert, welcher das spezifische Protein bindet. Die Detektion erfolgt über einen Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper, welcher den primären Antikörper bindet. Durch das gekoppelte Enzym wird eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion an der Position auf der Membran katalysiert, wo sich das spezifische Protein befindet.

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (Abschn.2.8.2.1) auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Sigma-Aldrich) erfolgte mit einem *Semi Dry Blot*-Verfahren unter Verwendung der Trans Blot SD SemiDry Transfer Cell (BIO-RAD). Hierfür wurden 2 Filterpapiere (GB003, Whatman, Dassel) in Anodenpuffer I, 1 Filterpapier in Anodenpuffer II und 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt und in dieser Reihenfolge übereinander auf die Anode gestapelt. Gel und Membran wurden zwischen den in Anodenpuffer II- und Kathodenpuffer-getränkten Filterpapieren fixiert. Der Blot-Vorgang erfolgte bei 22 V, 150 mA für 15 min. Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 h in Blockierungslösung geschwenkt und anschließend für 3x5 min. mit TBS-Tween20 gewaschen. Danach erfolgte eine 1 h-ige Inkubation mit dem primären Antikörper in TBS-Tween20 (Tab.2.8). Nach einem 5x5 min. Waschschrift mit TBS-Tween20 wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Tab.2.8) in TBS + 0,6 % Magermilchpulver inkubiert. Abschließend wurde die Membran 6x5 min. mit TBS-Tween20 gewaschen.

Für die Detektion von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern wurde das DAB-Enhanced Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion von Antikörpern, die mit Alkalischer Phosphatase

gekoppelt sind, erfolgte mit dem BCIP[®]/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris, 20 % Methanol

Anodenpuffer 2:

25 mM Tris, 20 % Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris, 40 mM Aminocapronsäure, 0.01 % SDS

TBS:

6 g Tris, 8.5 g NaCl, ad 1L aqua_{bidest}, pH 7.5)

Blockierungslösung:

TBS, 5 % Magermilchpulver

TBS-Tween20:

TBS, 0.5 % Tween20

2.8.3.3 Antikörper

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Antikörper, welche im Western Blot eingesetzt wurden.

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper

(AP - mit Alkalischer Phosphatase konjugiert, PO - mit Meerrettichperoxidase konjugiert, ¹Max von Pettenkofer Institut)

Antikörper	hergestellt in	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
<i>primäre Antikörper</i>			
anti-YscV IgG	Kaninchen	1:2000	diese Arbeit/Dianova
anti-YscM1 IgG	Kaninchen	1:5000	MvPI ¹ , München
anti-YscM2 IgG	Kaninchen	1:5000	MvPI ¹ , München
anti-SycH IgG	Kaninchen	1:5000	MvPI ¹ , München
anti-YopH IgG	Kaninchen	1:5000	MvPI ¹ , München
anti-YscF IgG	Kaninchen	1:5000	MvPI ¹ , München
anti-YadA IgG	Maus	1:1000	[130]
anti-His IgG	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich
anti-MBP IgG	Maus	1:10000-15000	New England Biolabs
<i>sekundäre Antikörper</i>			
anti-Maus IgG, PO ²	Ziege	1:2000	Sigma-Aldrich
anti-Maus IgG, AP ³	Ziege	1:2000	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen IgG, PO ²	Ziege	1:2000	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen IgG, AP ³	Ziege	1:2000	Sigma-Aldrich

2.8.4 Quervernetzung von Proteinen - *Crosslinking*

Crosslinker sind chemische Substanzen, die mit funktionellen Gruppen von Proteinen reagieren und diese unter Ausbildung von kovalenten Bindungen quervernetzen. Da die Quervernetzung ein Kriterium für eine große räumliche Nähe ist, lassen sich mit Crosslinkern intra- und intermolekulare Proteininteraktionen studieren. In dieser Arbeit wurden NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid) als Crosslinker verwendet (Tab.2.9). Sie reagieren mit α -Aminogruppen und ϵ -Aminogruppen von Lysinen und verknüpfen diese zu kovalenten Amidbindungen. Daher darf der Reaktionspuffer keine primären Amine enthalten.

Alle Versuche wurden in HEPES-Puffer bei pH 7.5 durchgeführt. Für die Reaktion wurden 50-200 μ M des jeweiligen Proteins und 2 mM Crosslinker eingesetzt und für 30 min. bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Tris, pH 7.5 und Inkubation für 15 min. bei RT abgestoppt. Danach konnte das Ergebnis in einer denaturierenden SDS-PAGE (Abschn.2.8.2.1) analysiert werden. Da hohe Konzentrationen von β -ME zur erneuten Spaltung des Crosslinkers führen können, enthielt der Lämmli-puffer nur 0.5 % β -ME (Abschn.2.8.2.1).

Tabelle 2.9: Verwendete Crosslinker von PIERCE

Bezeichnung	Lösungsmittel	Stamm- lösung	End- konzentration
DSP (Dithiobis[succinimidylpropionat])	DMSO	20 mM	1.5 mM
EGS (Ethylen Glycolbis[succinimidylsuccinat])	DMSO	20 mM	1.5 mM
Sulfo-EGS (Ethylen Glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinat])	aqua _{bidest}	10 mM	1.5 mM

2.9 Expression und Reinigung von Proteinen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Schritte zur Reinigung von Proteinen auf Eis bzw. in einem Kühlkabinett bei 6 °C durchgeführt. Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C.

2.9.1 Aufreinigung und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Die Überexpression von Proteinen führt häufig zur Produktion von *inclusion bodies* (IB), unlöslichen cytosolischen Aggregaten, die das exprimierte Protein oft in einem sehr homogenen, aber fehlgefalteten Zustand enthalten. Diese IBs können sehr leicht aufgereinigt werden.

Die Zellen wurden mit Bug Buster[®] Master Mix (Novagen[®]) nach Angaben des Herstellers lysiert und für 20 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat

für 20 min. bei 10.000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das IB-Pellet wurde in 30 ml IB-Waschpuffer I resuspendiert, für 1 h rotierend inkubiert und erneut für 20 min. bei 10.000 xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch 2x mit IB-Waschpuffer I und 3x mit IB-Waschpuffer II wiederholt. Für anschließende Reinigungsschritte mussten die Proteine aus den IBs solubilisiert werden. Dafür gibt es verschiedene Strategien, in den meisten Fällen werden jedoch starke Detergenzien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (GndHCl) verwendet, welche die Proteine vollständig denaturieren. Die IBs wurden in Solubilisierungspuffer aufgenommen, für 1 h rotierend bei RT inkubiert und anschließend wurde das Solubilisat für 20 min. bei 10.000 xg, 4 °C zentrifugiert.

IB-Waschpuffer I

50 mM Tris
1.5 M NaCl
60 mM EDTA
6 % Triton-X 100
pH 7.2

IB-Waschpuffer II

50 mM Tris
60 mM EDTA
pH 7.2

Solubilisierungspuffer

100 mM Tris
6 M GndHCl
pH 8.0

2.9.2 Reinigung von Proteinen mit Poly-Histidin-Epitop

2.9.2.1 Expression von Poly-Histidin-Fusionen

Für die Expression von Poly-Histidin-Fusionen wurde der pWS-Vektor verwendet, bei dem das Zielgen unter die Kontrolle eines P_{tac} -Promotors kloniert ist und somit IPTG-abhängig exprimiert wird. Der pWS-Vektor ist sehr gut für die Proteinexpression sowohl in *E. coli* als auch in *Y. enterocolitica* geeignet. Es wurden zwei Strategien gewählt:

Expression im Kolben Es wurden 400 ml LB-Medium+100 µg/ml Ampicillin 1:50 mit einer *E. coli* Übernachtskultur beimpft und im Schikanekolben bei 37 °C, 100 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0.6$ angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer Expression für 2 h wurde die Kultur geerntet und bei -20 °C eingefroren.

Expression im Fermenter Die Expression fand in einem 1.3 L Fermenter bei pH 7.4 und ausreichender Belüftung statt, welche durch eine ständige Anpassung der Rührgeschwindigkeit und des Gaseintrages konstant gehalten wurde. Die Expression in *E. coli* wurde bei 37 °C in LB-Medium+100 µg/ml Carb durchgeführt. Die Expression in *Y. enterocolitica* wurde bei 27 °C in LB-Medium+1 mM CaCl₂ +100 µg/ml Carb durchgeführt. Das Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ =0.4-0.6 inkubiert. Die Expression wurde mit 0.01 mM IPTG induziert und für 4 h durchgeführt. Die Kulturen wurden geerntet und bei -20 °C eingefroren.

2.9.2.2 Reinigung von Poly-Histidin-Fusionen

Die Reinigung von Poly-Histidin-Fusionen erfolgte mithilfe der „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC) unter Verwendung von HisTrap HP (5 ml) Säulen (GE Healthcare). Die Säulenmatrix besteht aus Sepharose[™], die mit einem Metall-Chelat-bildenden Liganden (NTA) gekoppelt ist, welcher Nickel-Ionen komplexiert. Bestimmte Aminosäurereste, vor allem Histidine, binden selektiv an die Ni⁺-Ionen, so dass man Proteine mit einem Poly-Histidin-Rest spezifisch aufreinen kann.

Die Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen erfolgte aus *inclusion bodies*, welche wie in Abschnitt 2.9.1 aufgereinigt und solubilisiert wurden. Das Solubilisat wurde mit 5 mM Imidazol versetzt, steril filtriert (Minisart, 0.2 µm, Sartorius) und auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule geladen. Die Reinigung erfolgte an einer ÄKTA*explorer* 100 Chromatografanlage (GE Healthcare) mit folgendem Programm:

- **5CV Waschpuffer** Abwaschen von unspezifisch gebundenen Proteinen
- **10CV Elutionspuffer** Elution der polyHis-Fusion in einem linearen Gradienten von 0-100 % Elutionspuffer
- **1CV Elutionspuffer** Waschen der Säule mit 100 % Elutionspuffer
- **5CV Waschpuffer** Re-Äquilibrierung

Die Eluat-Fractionen wurden in der SDS-PAGE analysiert (Abschn.2.8.2.1). Um das Imidazol zu entfernen, wurden die gepoolten Proteinfraktionen gegen einen entsprechenden Puffer dialysiert (Abschn.2.9.7).

Bindungspuffer

500 mM NaCl
100 mM KH₂PO₄
6 M GndHCl
5 mM Imidazol
pH 7.4

Waschpuffer

500 mM NaCl
100 mM KH₂PO₄
6 M GndHCl
40 mM Imidazol
pH 7.4

Elutionspuffer

500 mM NaCl
100 mM KH₂PO₄
6 M GndHCl
500 mM Imidazol
pH 7.4

2.9.3 Reinigung von MBP(Maltose-Bindeprotein)-Fusionsproteinen**2.9.3.1 Expression von MBP-Fusionsproteinen**

Für die Konstruktion von MBP-Fusionen wurde der kommerzielle Vektor pMAL-c2x (New England Biolabs) verwendet. Dieser Vektor enthält das *malE* Gen unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors P_{tac} und eine Erkennungssequenz für die Faktor Xa Protease, welche am 3'-Ende von *malE* codiert ist. Durch Klonierung eines Genes in den Polylinker des Vektors erhält man eine N-terminale Fusion des MBP an das gewünschte Protein, welche später durch Faktor Xa wieder abgespalten werden kann.

Die Expression der MBP-Konstrukte erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Für die Hauptkultur wurden 400 ml LB-Medium, supplementiert mit 0.2 % Glucose und 250 µg/ml Carb, 1:50 mit einer Übernachtskultur beimpft und im Schikanekolben bei 37°C, 100 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0.5 angezogen. Danach wurde die Kultur auf 18°C heruntergekühlt und die Expression durch Zugabe von 0.1 mM IPTG induziert. Nach einer Expression für ca. 16 h (ü.N.) bei 18°C wurde die Kultur geerntet und bei -20°C eingefroren.

2.9.3.2 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Die Reinigung der MBP-Fusionsproteine erfolgte über eine MBPTrap HP (5 ml) Säule (GE Healthcare), welche mit Dextrin-gekoppelter Sepharose gefüllt ist. Die Bindung von MBP an Dextrin ist sehr spezifisch, was eine sehr hohe Proteianreicherung bereits im ersten Reinigungsschritt ermöglicht.

Die Zellpellets wurden im Wasserbad aufgetaut und in Lysispuffer resuspendiert. Für die Lyse wurden rLysozyme™ Solution (10kU/ml Lysat) und Benzonase® (25-50U/ml Lysat) von Novagen® zugegeben und der Ansatz für 20 min. bei RT rotierend inkubiert. Das Lysat wurde für 20 min. bei 20.000 xg zentrifugiert und auf

eine mit MBP-Säulenpuffer äquilibrierte Säule geladen. Die Reinigung erfolgte an einer ÄKTA_{explorer} 100 Chromatografieanlage (GE Healthcare) mit folgendem Programm:

- **5CV Säulenpuffer** Abwaschen von unspezifisch gebundenen Proteinen
- **5CV Elutionspuffer** Elution der MBP-Fusion in einem Stufengradienten
- **5CV Säulenpuffer** Re-Äquilibrierung

Die Eluat-Fractionen wurden in der SDS-PAGE analysiert (Abschn.2.8.2.1). Um die Maltose zu entfernen, wurden die gepoolten Proteinfractionen über PD-10 Säulen umgepuffert oder zunächst die MBP-Fusion über Faktor Xa abgespalten (Abschn.2.9.3.3). Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren oder für weitere Analysen verwendet.

Lysispuffer

20 mM Tris
200 mM NaCl
1 mM DTT
pH 7.5
+ 1x Complete (EDTA-free) Protease Inhibitor Cocktail Roche Biochemicals)

Säulenpuffer

20 mM Tris
200 mM NaCl
1 mM DTT
pH 7.5

Elutionspuffer

20 mM Tris
200 mM NaCl
1 mM DTT
10 mM Maltose
pH 7.5

2.9.3.3 Faktor Xa-Verdau von MBP-Fusionensproteinen

Die Abspaltung von MBP-Fusionen nach der Expression diente der Gewinnung der Zielproteine in ihrer nativen Form. Faktor Xa Protease spaltet nach dem Arginin Rest in seiner bevorzugten Erkennungssequenz **Ile-Glu/Asp-Gly-Arg▼**. Für den Verdau wurden 0.5-1 % (w/w) Faktor Xa im Verhältnis zum Fusionsprotein eingesetzt. Die Spaltung wurde bei 23 °C für 2 h, 6 h bzw. 24 h durchgeführt.

2.9.4 Koexpressionsversuche mit molekularen Chaperonen

Die folgenden Plasmide wurden für die Koexpressionsversuche verwendet: pHisYscV_{c378} und pG-KJE8. Plasmid pG-KJE8 exprimiert die Chaperone DnaK-DnaJ-GrpE unter der Kontrolle eines *araB* Promotors (Arabinose-induzierbar) und die Chaperone GroEL-ES unter der Kontrolle eines *Ptz-1* Promotors (Tetracyclin-induzierbar). Plasmid pHisYscV_{c378} exprimiert das Zielprotein, die verkürzte cytoplasmatische Domäne von YscV, unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors.

Die Koexpressionen erfolgten in *E. coli* BL21 (DE3). Für die Hauptkultur wurden LB-Medium, supplementiert mit 250 µg/ml Carb und 20 µg/ml Cm, 1:50 mit einer Übernachtskultur beimpft und im Schikanekolben bei 37°C, 100 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0.6-0.8 angezogen. Danach wurde die Expression der Chaperone durch Zugabe von 10 mg/ml Arabinose und 20 ng/ml Tetracyclin induziert. Die Induktion des Zielproteins HisYscV_{c378} erfolgte 30 min. später durch Zugabe von 0.01 mM IPTG. Nach einer Expression für 4 h wurde die Kultur geerntet und bei -20°C eingefroren. Die Löslichkeit des Proteins wurde in der SDS-PAGE (Abschn.2.8.2.1) und in einer anschließenden Aufreinigung über IMAC (Abschn.2.9.2.2) überprüft.

2.9.5 Gelfiltration

In der Gelfiltration werden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da bei dieser Reinigungsmethode die Proteine nicht mit der Matrix wechselwirken, kann die Gelfiltration unter zahlreichen Pufferbedingungen durchgeführt werden. Gelfiltration kann genutzt werden, um Proteine zu reinigen bzw. von Aggregaten zu trennen, um das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen und damit auch Oligomerisierungszustände zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration zur Analyse von Oligomerisierungen und der Verteilung von Oligomerisierungszuständen angewendet. Diese Analysen wurden mit der Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) durchgeführt, welche Proteine im Bereich von 10-600 kDa auftrennt. Für die Analyse von hochmolekularen Proteinkomplexen von über 600 kDa wurde eine Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) verwendet, die Proteine/Proteinkomplexe bis 5x10⁶ kDa auflöst. Alle Gelfiltrationsanalysen wurden bei 6°C mit einem ÄKTAexplorer™ 100 Chromatografie System von GE Healthcare durchgeführt. Für die Analysen wurden zwischen 0.5-5 mg Protein auf die Säule aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Säulenauftrag für 10 min. bei 20.000 xg, 4°C zentrifugiert. Die Elution erfolgte bei konstanter Flussrate entsprechend den Säulenvorgaben des Herstellers. Die Eluate wurden fraktioniert und anschließend in der SDS-PAGE (Abschn.2.8.2.1) analysiert.

Folgende Puffervarianten wurden verwendet:

Tris-Puffer

20 mM Tris
100 mM NaCl
pH 7.5

HEPES-Puffer

25 mM HEPES
100 mM NaCl
pH 7.5

Phosphat-Puffer

20 mM Na₂HPO₄
100 mM NaCl
pH 7.5

2.9.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Konzentratoren (Millipore) für die Zentrifuge. Es wurden Konzentratoren für verschiedene Ausgangsvolumina (Amicon Ultra - 0.5 ml, 4 ml und 15 ml) mit einer Membran aus regenerierter Cellulose verwendet. Je nach der Größe des zu konzentrierenden Proteins wurde eine Membran mit der entsprechenden molekularen Ausschlussgröße (10 kDa oder 30 kDa) gewählt.

2.9.7 Umpuffern von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse oder über PD-10 Säulen. Das Umpuffern über PD-10 Säulen (GE Healthcare) basiert auf der Gelfiltrationstechnik. Die Säulen sind mit Sephadex[™] G-25 Medium befüllt und erlauben das Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen bis zu einem Volumen von 2.5 ml. Das Umpuffern erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Für die Dialyse wurden je nach Probenvolumen gebrauchsfertige Dialyse-Einheiten von PIERCE mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet (Tab. 2.10). Die Dialyse erfolgte unter Rühren bei 4 °C und einem Volumenverhältnis von Probe zu Puffer von 1:100. Nach 5-6 h erfolgte ein Pufferwechsel.

Tabelle 2.10: Verwendete Dialyse-Einheiten

Dialyse Einheit	Volumen	Membran
Slide-A-Lyzer [®] Mini Dialysis Unit	10-100 µl	regenerierte Cellulose
Slide-A-Lyzer [®] Mini Dialysis Cassette	0.5-3 ml	regenerierte Cellulose
Slide-A-Lyzer [®] Mini Dialysis Cassette	3-12 ml	regenerierte Cellulose

2.9.8 Rückfaltung von YscV

Die Rückfaltung von YscV wurde mithilfe des Pro-Matrix™ Protein Refolding Kit (PIERCE) durchgeführt. Dieses Kit beinhaltet 9 Basispuffer und 7 Pufferadditive. Bei den Basispuffern handelt es sich um Tris-Puffer, welche Guanidin-HCl (stark denaturierend) und Arginin (schwach denaturierend) in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Diese Agenzien liegen in Konzentrationen vor, die hoch genug sind, um aggregative Proteininteraktionen zu vermeiden, aber zu niedrig um die Proteine zu denaturieren. Zu den Pufferadditiven zählen unter anderem DTT, GSH (reduziertes Glutathion), GSSG (oxidiertes Glutathion), EDTA und PEG (Polyethylenglycol), welche zum Einen den Redoxzustand des Systems beeinflussen bzw. stabilisieren und zum Anderen mit hydrophoben Bereichen des ungefalteten Proteins interagieren und somit Aggregation vermeiden.

Für den primären Puffer-Screen wurden die folgenden Bedingungen gewählt:

Tabelle 2.11: Screening Bedingungen für die Rückfaltung von HisYscV_{c378}
jede Pufferbedingung wurde mit zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (25 µg/ml und 250 µg/ml) getestet

Basispuffer	DTT (mM)	EDTA (mM)	GSH (mM)	GSSG (mM)
1	5	1	2	0.2
2	5	1	2	0.4
3	5	1	1	1
4	5	1	2	0.4
5	5	1	1	1
6	5	1	2	0.2
7	5	1	1	1
8	5	1	2	0.2
9	5	1	2	0.4

Als Proteinmaterial wurde die denaturierend aufgereinigte verkürzte cytoplasmatische YscV-Domäne HisYscV_{c378} eingesetzt, die in 0.5 M NaCl, 0.1 M KH₂PO₄, 6 M Guanidin-HCl, pH 7.4 vorlag. Da die Proteinkonzentration einer der Hauptparameter bei Rückfaltungsprozessen ist, wurde die Rückfaltung für jede Pufferbedingung mit 2 Proteinkonzentrationen getestet: 25 µg/ml und 250 µg/ml. Um zu hohe lokale Proteinkonzentrationen in der Lösung zu vermeiden wurde die Proteinprobe mit einem zeitlichen Abstand von 1 min. in 2 Aliquots zu den Rückfaltungspuffern pipettiert. Die Rückfaltungsansätze wurden anschließend für 24 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden sie für 30 min. bei 25.000 xg, 4 °C zentrifugiert und die Überstände in der SDS-PAGE analysiert.

2.9.9 Vorliegende Proteinpräparationen

In Tabelle 2.12 sind die verwendeten Proteine aufgeführt, für die bereits ein etabliertes Aufreinigungsprotokoll existierte und welche nicht im Rahmen dieser Arbeit

hergestellt wurden.

Tabelle 2.12: Proteinpräparationen

Die aufgeführten Proteine lagen entweder aufgereinigt vor oder wurden von einem kommerziellen Hersteller bezogen

Protein	Funktion	Referenz/Hersteller
YscM1	sekretierter T3SS Regulator	[175]
YscM2	sekretierter T3SS Regulator	Kerrinnes <i>et al.</i> , unveröffentlichte Daten
YopH	Effektorprotein	[141]
SycH	YopH Chaperon	[110]
LcrV	Nadelspitzenprotein	[127]
YscEFG	T3SS Nadelprotein/Chaperone	Wilharm <i>et al.</i> , unveröffentlichte Daten
MBP	Maltose-Bindeprotein	Rockland Immunochemicals, Inc., USA

2.10 Analyse der Yop-Sekretion

Die Sekretion von *Yersinia* Effektoren in Flüssigkultur kann durch Anzucht der Yersinien bei 37°C und Depletion von Ca^{2+} -Ionen aus dem Medium, durch Zugabe des Ca^{2+} -Chelators EGTA, induziert werden [84]. Hierzu wurde LB-Medium + 0.2 mM CaCl_2 mit einer Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* 1:50 beimpft und für 2 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Induktion der Yop-Sekretion erfolgte anschließend durch Zugabe von 5 mM EGTA zum Medium und einer 2 h-igen Inkubation bei 37°C und 150 rpm. Der Kulturüberstand wurde durch Zentrifugation bei 25.000 xg, 4°C für 30 min. gewonnen. Die Fällung der Proteine erfolgte mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) auf Eis für 1 h aus 2 ml des gewonnenen Kulturüberstandes. Das Präzipitat wurde bei 25.000 xg, 4°C für 30 min. zentrifugiert und 2-mal mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Protein-Pellet getrocknet, in Lämmli-Puffer aufgenommen und direkt für die Analyse in der SDS-PAGE eingesetzt.

2.11 Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Gewinnung polyklonaler Antikörper wurde ein Kaninchen mit affinitäts-gereinigtem HisYscV_{c378} immunisiert. Die Immunisierung wurde von der Dianova GmbH, Hamburg durchgeführt. Aufgereinigtes HisYscV_{c378} lag in 20 mM Na_2HPO_4 , 6 M Harnstoff, pH 7.5 und einer Konzentration von 2.5 mg/ml vor. Vor Beginn der Immunisierung wurde das Präimmunserum im Western Blot auf Antikörper getestet. Die Immunisierung wurde nach dem Protokoll in Tabelle 2.13 durchgeführt. Zur Gewinnung des Serums wurde das entnommene Endblut für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 30 min. bei 6000 rpm, 4°C zentrifugiert. Das Blutserum wurde abgenommen und nochmals für 10 min. bei 6000 rpm, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 2.13: Angewendetes Immunisierungsprotokoll

Tag	Maßnahme	Immunisierung mit
0	Präimmunserum	
	1. Injektion	0.5 mg Protein in komplettem Freund'schen Adjuvans
28	2. Injektion	0.5 mg Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
42	3. Injektion	0.5 mg Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
56	4. Injektion	0.5 mg Protein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans
70	Endblutung	

2.12 Transmissionselektronenmikroskopie

In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, auch Transmissionselektronenmikroskop) werden kleine Objekte mithilfe von Elektronenstrahlen abgebildet. Der Aufbau eines TEM ähnelt dem eines optischen Mikroskops. Der hauptsächliche Unterschied besteht darin, dass eine Elektronenquelle statt einer Lichtquelle verwendet wird und dass für die Fokussierung des Elektronenstrahls elektromagnetische Linsen statt Glaslinsen eingesetzt werden. Die Auflösung eines TEM ist abhängig von der verwendeten Beschleunigungsspannung: je höher die Beschleunigungsspannung, desto kleiner ist die Wellenlänge. Bei einer Beschleunigungsspannung z.B. von 100 kV haben Elektronen eine Wellenlänge von 0.0039 nm. Damit liegt die Auflösung von Elektronenmikroskopen weit unter der Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen (Wellenlänge 380-750 nm). Für die Untersuchung biologischer Materialien wird üblicherweise der Bereich von 80-120 kV benutzt, da eine zu hohe Spannung das Material schädigt bzw. zerstört.

Biologische Präparate haben das Problem, dass sie einen hohen Wasseranteil besitzen, bei dessen Verlust es zu Strukturschäden kommen kann, und dass sie nur gering streuen und daher keinen ausreichend starken Kontrast erzeugen. Daher sind die Präparationstechniken darauf optimiert, die Wasserverlust-bedingten Präparatschäden gering zu halten und eine größtmögliche Kontrastierung zu erzeugen. Dies wird mit der Negativkontrastierung am Besten erreicht, weshalb sie die Methode der Wahl bei der Präparation biologischer Objekte ist. Das Prinzip der Negativkontrastierung besteht in der Einbettung der Materialien in ein amorphes, stark Elektronen-streuendes Material, welches im Elektronenstrahl stabil ist, z.B. Schwermetallsalze. Durch die Erhöhung der Dichte/Kontrastierung der Umgebung wird das Objekt negativ kontrastiert abgebildet. Im resultierenden EM-Bild erscheint daher das abgebildete Objekt hell und seine Umgebung dunkel.

2.12.1 Probenpräparation und Probenaufnahme

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit den Proteinen MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} angefertigt. Für die Präparation der Proben wurde die sukzessive Negativkontrastierung angewendet. Die Proteine wurden auf eine Konzentrati-

on von 0.1 mg/ml verdünnt und 5 µl davon auf ein Kohlefilm-bedampftes Netzchen pipettiert. Nach 2-minütiger Adsorption wurde überschüssige Proteinlösung abgewaschen. Die adsorbierten Proteine wurden anschließend mit 5 µl einer 1.5 %-igen (w/v) Uranylacetat-Lösung (pH 4.5) für 30 s gefärbt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem JEOL JEM 100CX Elektronenmikroskop bei einer 50-fachen Vergrößerung und einer Beschleunigungsspannung von 100 kV. Die Bilder wurden mit einem Defokussierungswert von 600-900 nm auf Imago-EM23 Filmen aufgenommen. Brauchbare Negative wurden anschließend digitalisiert. Die resultierende Pixelgröße in der Probe betrug 1.69 Å.

2.12.2 Bildbearbeitung

Unter Verwendung der EMAN Suite [93] wurden zunächst deutlich abtrennbare Proteinkomplexe semi-manuell aus den eingescannten Negativen ausgewählt und als Einzelbilder mit einer Größe von 200x200 Pixel gespeichert. Die nachfolgenden Schritte der Bildbearbeitung erfolgten unter Verwendung der Imagic Suite ([164]. Zuerst wurden die Einzelbilder unter Berücksichtigung der rotationsgemittelten Referenz iterativ in Translationsebene ausgerichtet (Translations- und Rotationsalignierung). Das heißt, die Einzelbilder, welche sich in ihrer Position und Orientierung in der Ebene unterscheiden, werden zur Deckung gebracht. Die Bilder wurden dann einer Band-Pass-Filterung unterzogen (Frequenzen $<10\text{Å}$ und $>150\text{Å}$ wurden unterdrückt), um unterschiedliche Helligkeitsverteilungen innerhalb der Bilder zu normalisieren. Anschließend wurden die Moleküle mit unterschiedlicher räumlicher Orientierung mithilfe der Multivariaten-Statistischen-Analyse (MSA) voneinander unterschieden. Hierbei werden die Pixel als Koordinatenachse dargestellt. Über die Varianz der Achsen werden die größten Unterschiede zwischen den Bilder erfasst. Als Ergebnis erhält man Eigenbilder, die die Hauptunterschiede im untersuchten Datensatz darstellen. Abschließend erfolgte die Klassifizierung der Bilder auf Grundlage der Intra-Klassenvarianz (Klassenmittelungen). Abbildung 2.1 gibt noch einmal einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Bildbearbeitung.

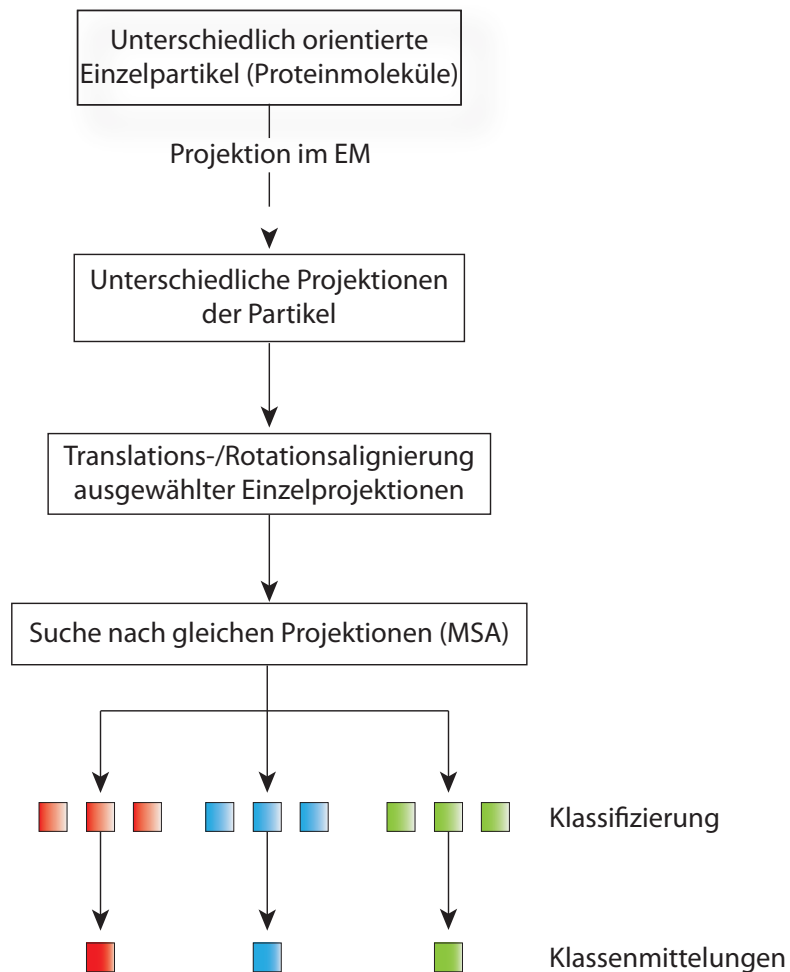


Abbildung 2.1: Flussdiagramm zur Bildbearbeitung der TEM-Aufnahmen
Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen EMAN Suite und IMAGIC Suite.

2.13 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (*engl: small-angle X-ray scattering, SAXS*) ist eine Methode, um die Struktur von Proteinen und anderen größeren Biomolekülen in Lösung zu charakterisieren. Es handelt sich um eine niedrig auflösende Strukturmethode mit einer unteren Auflösungsgrenze von ca. 10 Å. Das heißt, man kann die Größe und Form eines Proteins bestimmen, aber nicht seine atomare Struktur, wie es mittels der Röntgenkristallografie möglich ist. Trotzdem hat die Röntgenkleinwinkelstreuung einige Vorteile gegenüber der Kristallografie. Man kann Proteine in Lösung vermessen und ist nicht auf Kristalle angewiesen. Das ermöglicht es unter nahezu physiologischen Bedingungen zu messen. Außerdem können Konformationsänderungen erfasst werden und Oligomerisierungen und Wechselwirkungen studiert werden.

Die Proteinlösung wird mit einem monochromatischen Röntgenstrahl durchstrahlt und alle Winkel der gestreuten Röntgenstrahlung in ihrer Intensität detektiert. Da

die Proteine in Lösung zufällig orientiert vorliegen, erhält man mit dieser Methode keine Richtungsinformationen, sondern nur eine Verteilung der gestreuten Winkelintensitäten, die als Abstandsverteilung bezeichnet wird. Diese Abstandsverteilung verhält sich reziprok zur Größe der gemessenen Proteine, das heißt je größer das Molekül, desto kleiner die Streuwinkel. Die Abstandsverteilung gibt die vorhandenen Abstände im gemessenen Protein wider, somit kann die räumliche Struktur des Proteins aus der Abstandsverteilung berechnet werden.

Die Messungen wurden in Kooperation mit dem EMBL, Hamburg, am Speicherring DORIS des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron), Strahlengang X33, unter Betreuung von Dr. Manfred Rössle aufgenommen [133]. Um Strahlenschäden zu vermeiden, wurden die Proben 8-mal für jeweils 15 s bestrahlt. Die Kalibrierung erfolgte gegen den Puffer, in dem die Probe vermessen wurde. Die Messung erfolgte bei 10 °C. Die Proben wurden in einer Konzentration von 2 µg/µl in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) gemessen.

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket ATSAS, welches Programme zur Verarbeitung der Rohdaten, zur Berechnung von drei-dimensionalen *ab initio* Modellen und zur Berechnung von Komplexen auf der Basis von hochauflösenden Kristallstrukturen enthält [77].

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte YscV erstmals genauer strukturell und funktionell charakterisiert werden, da sich bisherige Analysen auf die experimentelle Bestimmung der Membrantopologie und die phänotypische Beschreibung von Deletionsvarianten von YscV beschränkt hatten. Da YscV über seinen N-Terminus in der inneren Membran verankert ist und sich das Vollängenprotein somit unlöslich verhalten würde, sollten die Analysen zunächst mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne erfolgen. Um die Aminosäurepositionen für die Klonierung der zytoplasmatischen Domäne auswählen zu können, wurden zunächst *in silico* Analysen des Proteins durchgeführt, um den Übergangsbereich zwischen der transmembranen und der zytoplasmatischen Domäne genauer zu definieren.

3.1 *in silico* Charakterisierung der Struktur und Membrantopologie von YscV

Lokalisierungsstudien und die Analyse von *yscV*-*TnphoA* Genfusionen ergaben, dass YscV aus *Y. pestis* mit 8 Transmembranhelices (TMH 1-8) in der inneren Bakterienmembran verankert ist und der N- und C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind [122]. Die genaue Eingrenzung dieser Helices, allein basierend auf diesen experimentellen Daten ist jedoch schwierig. Daher wurden die experimentellen Ergebnisse mit vier verschiedenen Membran-Topologie-Vorhersageprogrammen (TMHMM, TopPred II, Phobius, SVMtop) verglichen, um eine genauere Membrantopologie für YscV bestimmen zu können. Die Programme unterscheiden sich teilweise in der Vorhersage der Anzahl der Transmembranhelices und der Orientierung der C-terminalen Domäne (Abb.3.1). Beispielsweise lokalisieren Phobius und TopPred II die C-terminale Domäne im Periplasma. Dies resultiert aus dem Umstand, dass sie nur 7 statt der 8 experimentell ermittelten Transmembranhelices für YscV vorhersagen. Basierend auf den experimentellen Ergebnissen zur Membrantopologie von YscV und Homologen wie z.B. InvA aus *Salmonella enterica* (*S. enterica*) [47] und HrcV aus *Xanthomonas campestris* [13] befindet sich der C-Terminus aber mit großer Sicherheit im Zytoplasma.

Der experimentell bestimmte Bereich für die TMH-8 (Aminosäuren 330-347) wird in Hydrophobizitätsberechnungen nach Kyte-Doolittle als hydrophil eingestuft. Daher

befindet sich die letzte Transmembranhelix vermutlich eher im Bereich der Aminosäuren 300-321, welche durch Phobius und SVM $_{top}$ als TMH-8 berechnet wurden (Abb.3.1). YscV gehört, als Bestandteil des Exportapparates, zu den konserviertes-

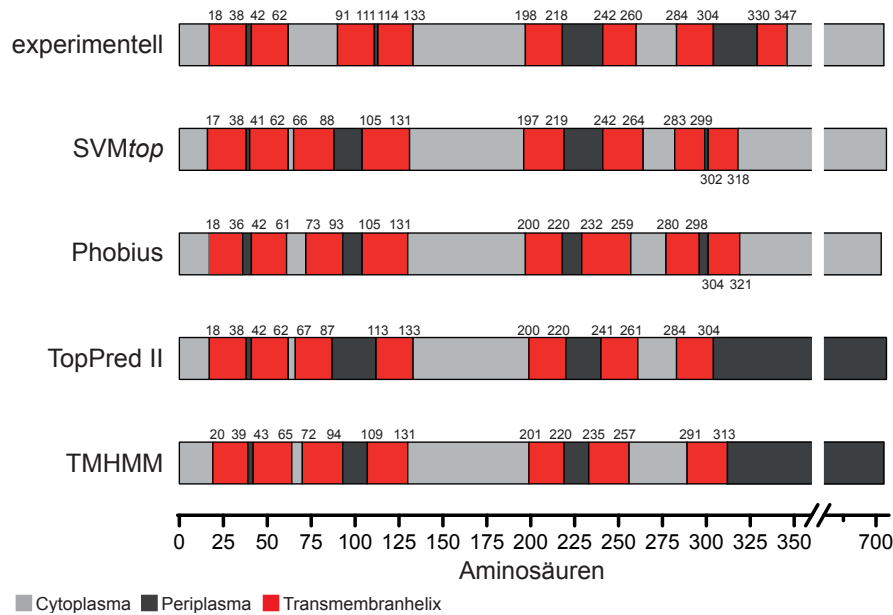
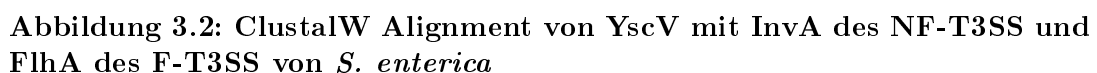


Abbildung 3.1: Vergleich der experimentell und *in silico* bestimmten Membrantopologie von YscV

Die experimentell ermittelte Membrantopologie von YscV (oberste Reihe) wurde mit den berechneten Modellen der Membran-Topologie-Vorhersageprogramme TMHMM, TopPred II, Phobius und SVM $_{top}$ verglichen. Die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich, vor allem in Bezug auf die Lokalisierung des C-Terminus. Die Programme TopPred II und TMHMM lokalisieren den C-Terminus im Periplasma, während *yscV*-TnphoA Genfusionen und die Programme Phobius und SVM $_{top}$ den C-Terminus im Zytoplasma lokalisieren. Bezüglich der Transmembranhelices werden 7 bzw. 8 Stück vorhergesagt.

ten Komponenten des T3SS. Es besitzt Homologe in allen F-T3SS und NF-T3SS. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von YscV mit zwei seiner Homologen, InvA des NF-T3SS und FlhA des F-T3SS aus *S. enterica*, ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Im Alignment sind außerdem die Lokalisierung der 8 Transmembranhelices (Phobius) und Sekundärstrukturmotife der zytoplasmatischen Domäne, welche mit PSIPRED [69] vorhergesagt wurden, eingezeichnet. Der N-Terminus, welcher mit der letzten Transmembranhelix (TMH-8) endet, zeigt einen besonders hohen Konservierungsgrad. Der nachfolgende Bereich des Proteins bis ungefähr zur AS 380, ist am wenigsten zwischen den drei Proteinen konserviert und scheint eher unstrukturiert zu sein. Er könnte als Linker-Domäne zwischen der transmembranen und zytoplasmatischen Domäne fungieren, wie es für FlhA aus *S. enterica* gezeigt wurde [137]. Der Rest der zytoplasmatischen Domäne zeigt wieder eine recht hohe Konservierung. Er ist hauptsächlich α -helikal mit einem einzelnen ausgedehnten β -Faltblattbereich zwischen AS 400-480. Die Verteilung dieser Sekundärstrukturen spiegelt sich gut in dem weiter unten beschriebenen 3D-Modell von YscV $_c$ wider.



rote Boxen - Transmembranhelices TMH-1-8, welche mit Phobius vorhergesagt wurden. H, grüne Box - α -Helix; E, blaue Box - β -Faltblatt; mit PSIPRED vorhergesagte Sekundärstrukturen der zytoplasmatischen Domäne. YscV_{c326} - Start für die Klonierung der vollständigen zytoplasmatischen Domäne, YscV_{c378} - Start für die Klonierung der verkürzten zytoplasmatischen Domäne.

Berechnungen mit SignalP zur Vorhersage von Signalpeptiden für die Sekretion von YscV durch bekannte bakterielle Transportsysteme, wie z.B. den Sec-abhängigen Proteintransport, ergab keine Treffer. Auch für homologe Proteine von YscV sind keine Transportsignale bekannt. Es ist bisher nicht klar, über welchen Mechanismus YscV in die Membran eingebaut wird.

Mithilfe des Vorhersageprogrammes Phyre wurde basierend auf der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne von InvA aus *S. enterica* ein Homologie-basiertes 3D-Modell für die Aminosäuren 350-704 von YscV berechnet.

Das Modell zeigt 2 Domänen, die durch eine längere α -Helix miteinander verbunden sind (Abbildung 3.3). Die N-terminale Domäne besteht aus einem β -Faltblatt,

gefolgt von einer α -Helix und drei antiparallelen β -Faltblättern. Die C-terminale Domäne ist globulär und besteht weitgehend aus α -Helices. In der Seitenansicht des Modells sind die Domänen durch die hufeisenförmige Konformation erkennbar (Abbildung 3.3, rechts). Der linke Schenkel des Hufeisens repräsentiert die N-terminale Domäne und der rechte Schenkel die C-terminale Domäne.

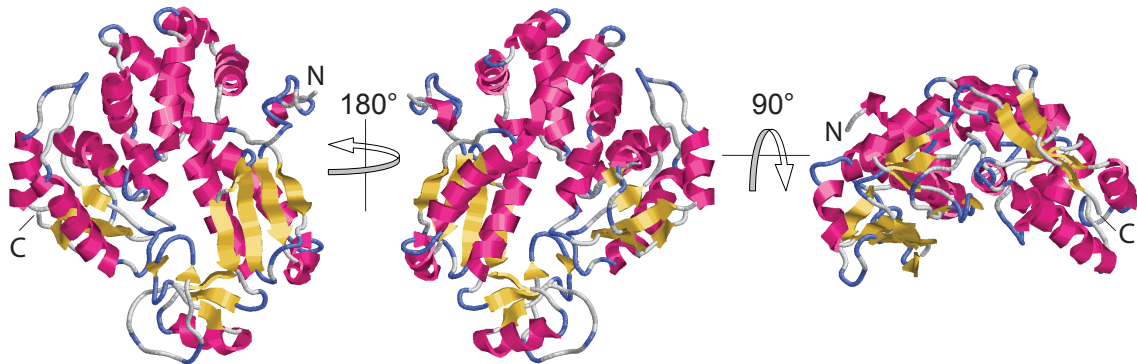


Abbildung 3.3: Homologie-basiertes 3D-Modell der zytoplasmatischen Domäne von YscV Das Modell wurde mit dem Proteindatenbank (PDB)-basierten Programm Phyre für die C-terminalen Aminosäuren 350-704 von YscV berechnet. Zu sehen ist die Vorder-, Rück- und Seitenansicht des Modells (von links nach rechts). Die zytoplasmatische Domäne besitzt eine Hufeisen-förmige Konformation mit einem möglicherweise sehr flexiblen zentralen Linkerbereich.

3.2 Strategien zur Reinigung der zytoplasmatischen Domäne von YscV

3.2.1 Generelle Klonierungsstrategie

Für alle angewendeten Klonierungs- und Aufreinigungsstrategien der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne YscV_c wurden zwei Varianten verwendet. Sie wurden aus den kombinierten Daten der *in silico* Vorhersagen der Transmembranhelices, der Sekundärstruktur der zytoplasmatischen Domäne (Abschn. 3.1) und der Klonierungsstrategie für die zytoplasmatische Domäne von FlhA abgeleitet [137]. Die erste Variante umfasst die vollständige zytoplasmatische Domäne und beginnt unmittelbar nach der letzten vorhergesagten Transmembranhelix bei Aminosäure 326. Diese Variante wurde entsprechend mit YscV_{c326} bezeichnet. Die zweite Variante umfasst eine verkürzte zytoplasmatische Domäne, bei der der N-terminale, vermutlich unstrukturierte Bereich fehlt, da dieser sich negativ auf die Stabilität des Proteins auswirken könnte. Diese Variante ist um 52 Aminosäuren kürzer als YscV_{c326}, beginnt daher bei Aminosäure 378, und wurde als YscV_{c378} bezeichnet. Der Beginn beider Konstrukte ist im Alignment in Abbildung 3.2 gezeigt.

3.2.2 Reinigung von YscV_c als Histidin-Fusionsprotein

3.2.2.1 Klonierung

Für die Klonierung der YscV-Varianten mit Histidin-Tag wurden die Primerpaare YscV_{c326}-for/YscV_c-rev bzw. YscV_{c378}-for/YscV_c-rev verwendet, welche N-terminal einen 8xHistidin-Tag und eine TEV-Schnittstelle einführen. Die TEV-Schnittstelle sollte der späteren Entfernung des 8xHistidin-Tags dienen. Die Amplifizierung erfolgte an genomischer DNA von *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) WA-314. Über die Primer wurden Schnittstellen für NdeI und SalI eingeführt. Sie dienten der anschließenden Klonierung in den pWS-Vektor (Abb. 3.4). Der pWS-Vektor wurde gewählt, weil er sich für die Expression sowohl in *Escherichia coli* (*E. coli*) als auch in *Y. enterocolitica* eignet. Die korrekte Sequenz der positiven Klone wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die konstruierten Plasmide, welche 8xHis-TEV-YscV_{c326} bzw. 8xHis-TEV-YscV_{c378} enthielten, wurden als pHisYscV_{c326} bzw. pHisYscV_{c378} bezeichnet. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch die abgeleitete Aminosäuresequenz für HisYscV_{c326} (Abb. 3.4) nach Klonierung in pWS.

3.2.2.2 Expression und Reinigung

Versuche zur Evaluierung der optimalen Expressionsbedingungen zeigten, dass sich beide Konstrukte unabhängig vom Expressionsstamm (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS oder *Y. enterocolitica* WA-314), der Expressionstemperatur (27°C/37°C), der Expressionsdauer und der Stärke der Expressionsinduktion (0.1-1 mM IPTG) vollständig unlöslich verhielten.

Abbildung 3.5a zeigt das Ergebnis einer Pilotaufreinigung beider YscV_c-Varianten. Die Expression erfolgte für 4 h bei 27°C. Die Aufreinigung erfolgte über IMAC. Das gesamte produzierte Protein findet sich nach dem Zellaufschluß als unlösliches Aggregat in *inclusion bodies* (IB) wieder (Abb. 3.5a, Spur 1 und 5). Die Proteinbanden, welche in den Eluatfraktionen beider Konstrukte bei ungefähr 45 kDa erkennbar sind (Abb. 3.5a, Spur 4 und 8), konnten im Western Blot mit einem anti-His Antikörper nicht als YscV verifiziert werden (nicht gezeigt). Daher erfolgten alle folgenden Expressionen zugunsten der größeren Ausbeute in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS bei 37°C für 2 h mit 1 mM IPTG für die Expressionsinduktion. Da beide YscV-Varianten als unlösliche *inclusion bodies* vorlagen, erfolgte die gesamte Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid (GndHCl) zu allen Puffern. Es wurden zunächst die *inclusion bodies* aufgereinigt, dann die Proteine solubilisiert und anschließend über IMAC aufgereinigt. Abbildung 3.5b zeigt das Ergebnis der IB-Aufreinigung von HisYscV_{c378} (Spuren 1-3) und HisYscV_{c326} (Spuren 4-6). Die präparierten Proteine wurden jeweils in aufsteigender Konzentration in der SDS-PAGE analysiert. Durch die IB-Präparation erfolgte zwar eine Anreicherung von HisYscV_{c378} und HisYscV_{c326} gegenüber unspezifischen Proteinen,

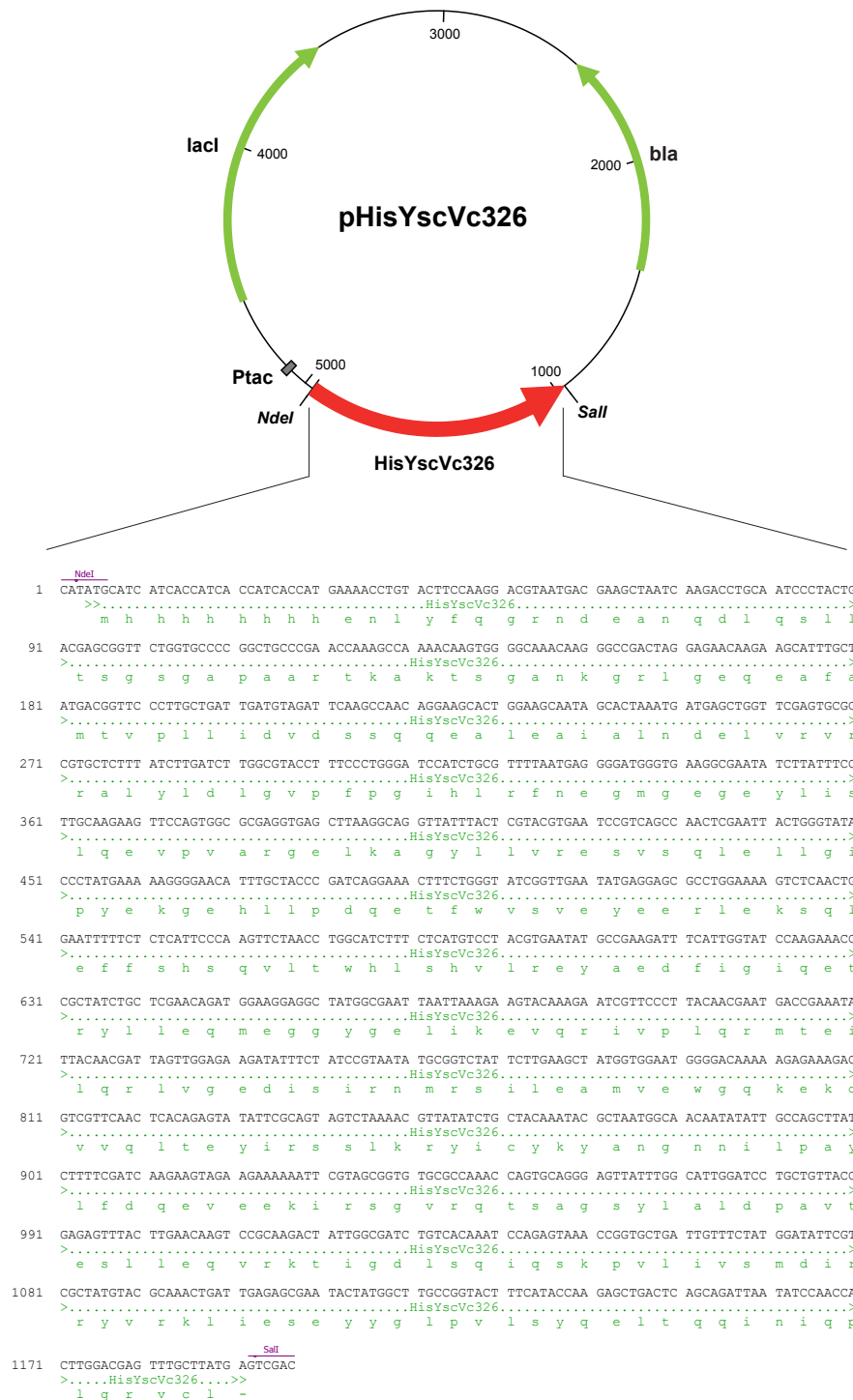


Abbildung 3.4: Konstruktion des Plasmides pHisYscV_{c326}

Sequenz der vollständigen zytoplasmatischen Domäne YscV_{c326} mit N-terminaler 8xHis-TEV-Fusion nach Ligation in pWS. Das Insert wurde über die Restriktionsenzyme NdeI und SalI unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors in den pWS Vektor kloniert. Die resultierende translatierte Proteinsequenz ist grün dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind lila markiert. Die Konstruktion von pHisYscV_{c378} erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

Ptac Promotor, *lacI* Lac-Repressor, *bla* β -Lactamase Enzym

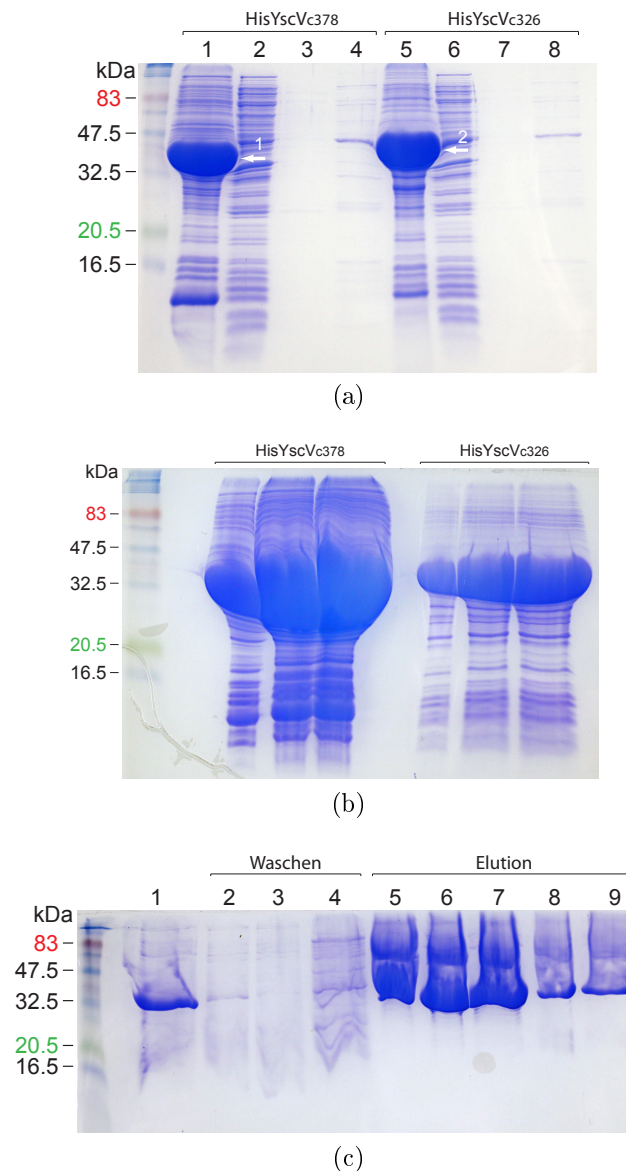


Abbildung 3.5: IB-Präparation und affinitätschromatografische Reinigung von HisYscV_c

Coomassie-gefärbte 15 % SDS-Gele. (a) HisYscV_{c378} (Spuren 1-4) und HisYscV_{c326} (Spuren 5-8) wurden bei 27°C für 4 h in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels IMAC aus dem löslichen Zellüberstand. 1 unlösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation, 2 lösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation, 3 Elution mit 20 mM Imidazol, 4 Elution mit 400 mM Imidazol, 5 unlösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation, 6 lösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation, 7 Elution mit 20 mM Imidazol, 8 Elution mit 400 mM Imidazol, weiße Pfeile: 1 unlösliches HisYscV_{c378}, 2 unlösliches HisYscV_{c326} (b) IB-Präparation von HisYscV_{c378} (links) und HisYscV_{c326} (rechts). Ein Teil der aufgereinigten *inclusion bodies* wurde in Lämmli-Puffer aufgenommen und jeweils 3 µl, 5 µl und 7 µl davon im SDS-Gel aufgetrennt. (c) Affinitätsreinigung von HisYscV_{c378} über IMAC. Aufgereinigte *inclusion bodies* wurden in 6 M GndHCl-Puffer solubilisiert und anschließend über eine HisTrap HP (5ml) Säule aufgereinigt. Die Elution erfolgte in einem linearen Imidazol-Gradienten. 1 Überstand nach IB-Solubilisierung, 2 Säulendurchlauf, 3-4 Waschfraktionen, 5-9 Eluatfraktionen

der Anteil an Proteinverunreinigungen war jedoch noch sehr groß. Abbildung 3.5c zeigt exemplarisch das Ergebnis der anschließenden denaturierenden Aufreinigung von HisYscV_{c378} über IMAC. Danach lag HisYscV_{c378} in einer Reinheit von über 90 % vor. Der Verschleppungseffekt der Banden entsteht durch die hohe Konzentration an GndHCl im Elutionspuffer. Die Ausbeute betrug ca. 30 mg HisYscV_{c378} aus 400 ml Kultur, dies ist jedoch wahrscheinlich eine Unterschätzung, da die Proteinbestimmung nach Bradford durch den hohen Anteil an GndHCl stark beeinträchtigt wird.

Mit dem Konstrukt HisYscV_{c378} wurden auch die anschließenden Rückfaltungsexperimente (Abschnitt 3.2.3) durchgeführt und das polyklonale YscV Antikörperserum (Abschn.3.2.4) produziert.

3.2.3 Rückfaltung von HisYscV_{c378}

In Rückfaltungsexperimenten sollte versucht werden, das denaturierend aufgereinigte HisYscV_{c378} in seine native Konformation zurückzufalten. Hierfür wurde das Pro-Matrix[™] Protein Refolding Kit (PIERCE) verwendet. Das gereinigte HisYscV_{c378} konnte direkt für die Rückfaltung eingesetzt werden, da alle Rückfaltungspuffer neben Arginin auch GndHCl als denaturierende Agenzien enthielten. In einem Primärscreen wurden 9 Pufferbedingungen mit einem unterschiedlichen Verhältnis von Arginin und GndHCl, wechselnden Redoxbedingungen und jeweils 2 Proteinkonzentrationen getestet (Abschn. 2.9.8). Die Rückfaltungspuffer enthielten 0-0.8 M Arginin und 0-1.4 M GndHCl. Die zwei getesteten Proteinkonzentrationen betrugen 25 µg/ml und 250 µg/ml im Rückfaltungsansatz.

Bei einer erfolgreichen Rückfaltung wird denaturiertes bzw. fehlgefaltetes Protein wieder in seine native Konformation zurückgefaltet, was in einer verbesserten Löslichkeit des Proteins resultiert. Daher wurde zunächst durch Zentrifugation der Rückfaltungsansätze getestet, wieviel Protein löslich war und daher im Überstand verblieb. Bei drei der neun getesteten Rückfaltungspuffer (RP 3, 6 und 9) konnte YscV in der löslichen Fraktion detektiert werden, besonders bei den Ansätzen mit höherer Proteinkonzentration (Abb. 3.6a, Spur 3, 6 und 9 und Abb. 3.6b, Spur 12, 15 und 18). Alle drei Puffer enthielten die höchste Konzentration an Arginin (0.8 M), aber unterschiedliche Konzentrationen an GndHCl (0-1.1 M). Nach der Rückfaltung in Puffer 3 mit 250 µg/ml HisYscV_{c378} konnte die größte Menge an HisYscV_{c378} im Überstand detektiert werden (Abb.3.6b, Spur 12). Dieser Puffer enthielt 300 mM GndHCl. Für die Rückfaltung von YscV spielt also die Anwesenheit von Arginin eine essentielle Rolle, während GndHCl vor allem in Konzentrationen bis 300 mM stabilisierend auf den Rückfaltungsprozess wirkt.

Anschließend wurde die Stabilität der rückgefalteten Fraktionen in den Rückfaltungspuffern 3, 6 und 9 untersucht (Abb.3.6c). Hierfür wurden die Fraktionen gegen einen Detergenz-freien Tris-Puffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5) und gegen

Tris-Puffer mit 0.1 % Triton X-100 dialysiert, um Arginin und GndHCl aus der Probe zu entfernen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Menge an HisYscV_{c378} in den Überständen der dialysierten Fraktionen mit den entsprechenden Rückfaltungsfractionen verglichen. Hierbei zeigte rückgefaltetes HisYscV_{c378} aus Rückfaltungspuffer 3 (HisYscV_{c378} -RP 3) die größte Stabilität (Abb. 3.6c, Spur 1-3). HisYscV_{c378} -RP 6 fiel in allen drei Ansätzen fast vollständig aus (Abb. 3.6c, Spur 4-6) und HisYscV_{c378} -RP 9 blieb nur nach Dialyse gegen den Tris-Triton X-100 Puffer stabil (Abb. 3.6c, Spur 7-9). HisYscV_{c378} -RP3 war nach dem Einfrieren bei -20 °C bzw. -80 °C allerdings nur im Tris-Triton X-100 Puffer stabil (nicht gezeigt), weshalb nur mit diesem Puffer weitere Untersuchungen vorgenommen wurden.

YscV_{c378} sollte mithilfe von SAXS-Analysen strukturell charakterisiert werden. Die

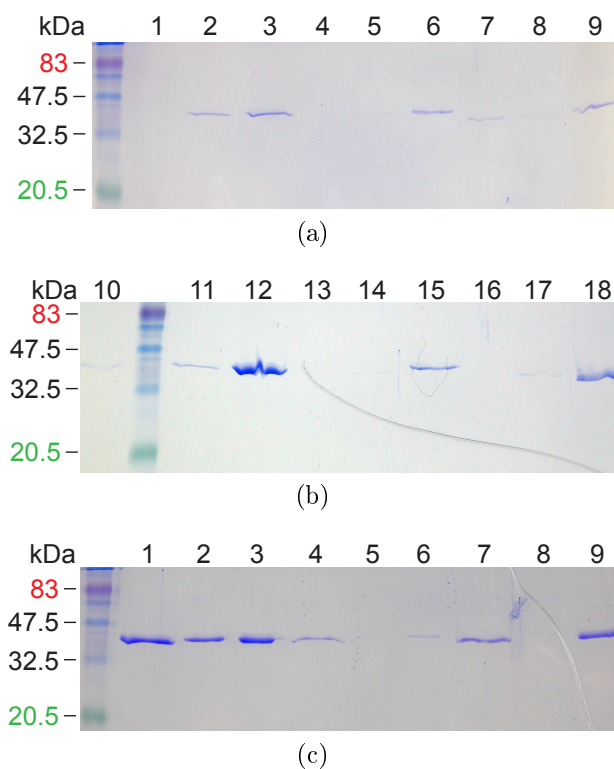


Abbildung 3.6: Rückfaltung von denaturierend aufgereinigtem HisYscV_{c378}
Coomassie-gefärbtes 15 % SDS-Gel. (a) lösliches HisYscV_{c378} im Überstand nach 24 h Rückfaltung in den Rückfaltungspuffern 1-9 (Spuren 1-9) (b) lösliches HisYscV_{c378} im Überstand nach 24 h Rückfaltung in den Rückfaltungspuffern 10-18 (Spuren 10-18) (c) Stabilität von HisYscV_{c378} nach Dialyse des Rückfaltungsansatzes gegen einen Detergenz-freien Tris-Puffer und gegen Tris-Puffer mit 0.1 % Triton X-100.

Spuren 1-3 HisYscV_{c378} -RP 3: 1 vor Dialyse, 2 in Tris-Puffer, 3 in Tris-TritonX-Puffer
Spuren 4-6 HisYscV_{c378} -RP 6: 4 vor Dialyse, 5 in Tris-Puffer, 6 in Tris-TritonX-Puffer
Spuren 7-9 HisYscV_{c378} -RP 9: 7 vor Dialyse, 8 in Tris-Puffer, 9 in Tris-TritonX-Puffer

Vermessung der Proben erbrachte jedoch keine verwertbaren Daten, da die Anwesenheit von Triton X-100 eine nicht auswertbare Streuung in der Probe erzeugte. Der Austausch von Triton X-100 gegen das ebenfalls nicht-ionische Detergenz DDM (Dodecylmaltosid) erbrachte denselben Effekt. Desweiteren zeigte eine Analyse von

rückgefaltetem YscV_{c378} in der *BlueNative*-PAGE keine diskreten Proteinbanden (nicht gezeigt). Das legt nahe, dass die Rückfaltung nur unvollständig war und ein Gemisch aus verschiedenen, möglicherweise unvollständig gefalteten Konformeren in Lösung vorlag, welches eine echte Rückfaltung in eine native Konformation nur simulierte. Daher wurde die Rückfaltungsstrategie nicht weiter verfolgt.

3.2.4 Herstellung eines polyklonalen YscV-Antikörpers

Für die Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers wurde denaturierend gereinigtes HisYscV_{c378} verwendet. Die Immunisierung wurde von der Dianova GmbH, Hamburg nach einem Protokoll, wie unter Abschnitt 2.11 beschrieben, durchgeführt. Das Immunisierungsserum wurde im Western Blot auf die Existenz von anti-YscV Antikörpern getestet und die Sensitivität mit einem kommerziellen Histidin-Antikörper verglichen (Abb. 3.7). Als Probe diente denaturierend gereinigtes HisYscV_{c378}, welches in einer Konzentrationsreihe von 5 µg bis 50 ng eingesetzt wurde. Die Detektion von HisYscV_{c378} mit anti-YscV Serum war ca. um den Faktor 5 sensitiver als die Detektion mit anti-His (vgl. Abb. 3.7a und b).

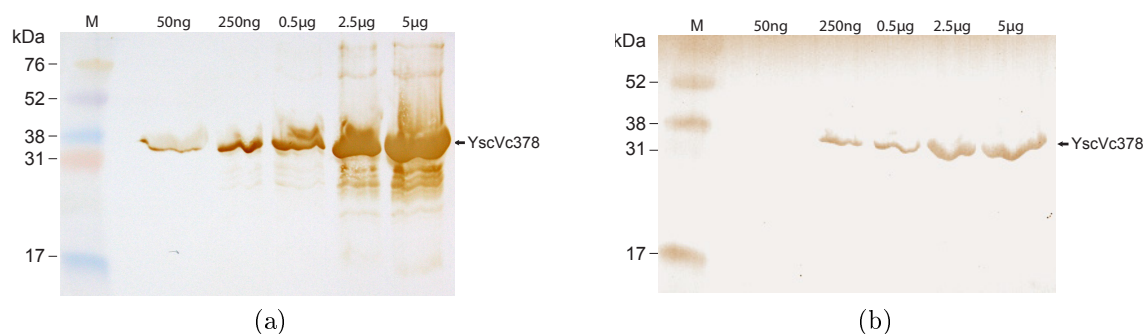


Abbildung 3.7: Validierung des anti-YscV Serums aus Kaninchen

Als Probe diente denaturierend gereinigtes HisYscV_{c378}, das in einer Verdünnungsreihe von 5 µg bis 50 ng eingesetzt wurde (a) Western Blot mit anti-YscV Serum aus Kaninchen, 1:2000 verdünnt (b) monoklonaler anti-His Antikörper (Sigma-Aldrich), 1:2000 verdünnt

3.2.5 Die Überproduktion von YscV aktiviert die Hitzeschockproteine IbpAB

Bei der Expression der YscV-Varianten fiel auf, dass eine zweite Proteinspezies mit einer Größe von ungefähr 15 kDa in den *inclusion bodies* angereichert wurde (Abb. 3.8 Stern). Diese trat jedoch nur auf, wenn das Vollängenprotein oder die verkürzte zytoplasmatische YscV-Domäne, HisYscV_{c378}, exprimiert wurden, nicht aber bei der Expression der vollständigen zytoplasmatischen Domäne HisYscV_{c326}. Durch eine Analyse im WesternBlot konnte ausgeschlossen werden, dass es sich

um ein Abbauprodukt von YscV handelte, da die Bande weder mit anti-YscV Serum noch mit anti-His Antikörpern detektiert werden konnte. Um das korrespon-

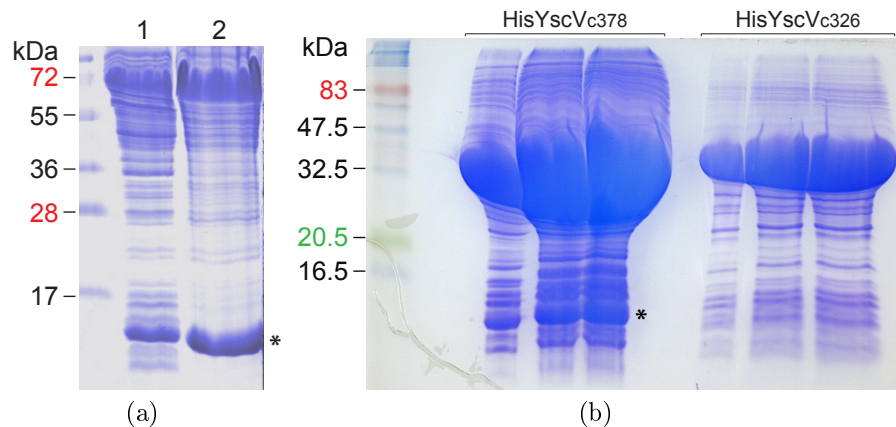


Abbildung 3.8: Anreicherung der Hitzeschockproteine IbpAB in *inclusion bodies* von YscVHis und HisYscV_{c378}

Coomassie-gefärbte 15 % SDS-Gele (a) IB-Präparation von HisYscV nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. 1 Zellysat 2 IB-Präparation (b) IB-Präparationen von HisYscV_{c378} (Spuren 1-3) und HisYscV_{c326} (Spuren 4-6) nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Es wurden jeweils 3 µl, 5 µl und 7 µl von der IB-Präparation aufgetragen. Das Sternchen markiert das unbekannte 15 kDa Protein.

dierende Protein zu identifizieren, wurde die Proteinbande ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert¹. Die Analyse erfolgte über nanoLC-MS/MS (Flüssig-Chromatografie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie). Dies ist ein Analysen- und Detektionsverfahren, welches die Identifizierung und Quantifizierung nicht nur von reinen Proteinen sondern auch von Proteingemischen ermöglicht. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden mit bekannten Peptiden in der Mascot Datenbank auf Basis der MS/MS Ion-Suchmethode verglichen [114]. Es wurden zwei signifikante Treffer für die Proteine IbpA und IbpB erhalten, welche als Gemisch mit ungefähr gleichen Anteilen vorlagen. In Abbildung 3.9 sind die massenspektrometrisch identifizierten Peptide in den Proteinsequenzen von IbpA und IbpB aus *E. coli* K-12 MG1655 rot markiert hervorgehoben. IbpA und IbpB sind in *E. coli* die einzigen bisher beschriebenen Mitglieder der sogenannten kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins*, sHsp). Sie wurden als Proteine identifiziert, welche mit *inclusion bodies* heterolog exprimierter Proteine assoziiert waren [6]. IbpA und IbpB finden sich aber auch in Proteinaggregaten, die in Folge von Hitzestress gebildet werden. Analysen haben gezeigt, dass ihre Assoziation die Eigenschaften der *inclusion bodies*, wie z.B. ihre Größe, verändert und eine wichtige Voraussetzung für die anschließende Reaktivierung der Proteine durch das Chaperon System ClpB-DnaK-DnaJ-GrpE ist [126]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit beider Proteine nötig ist, damit die Renaturierung der aggregierten Proteine durch ClpB-DnaK-DnaJ-

¹Dr. Guido Sauer, Labor für Massenspektrometrie, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen

> IbpA *E. coli* K-12 MG1655

```
1 mrnfdlsply rsaigfdrlf nhleqqsqsq nggyppynve lvdenhyria iavagfaese
61 leitaqdnll vvkghadeq kertylyqgi aernferkfq laenihvrga nlvngllyid
121 lervipeakk prriein
```

(a)

> IbpB *E. coli* K-12 MG1655

```
1 mrnfdlsplm rqwigfdkla nalqnagesq sfppynieks ddnhyritle lagfrqedle
61 iqlegtrlsv kgtpeqpkee kkwihqglm qpfslsftla enmevsgatf vngllhidli
121 rnepepiaaq riaiserpal ns
```

(b)

Abbildung 3.9: Massenspektrometrische Identifizierung von IbpAB in *inclusion bodies* von YscVHis und HisYscV_{c378}

Die 15 kDa Bande aus den IB-Präparationen von YscVHis und HisYscV_{c378} wurde massenspektrometrisch analysiert und durch Vergleich der erhaltenen Peptide mit der Mascot-Datenbank als ein Gemisch aus den Hitzeschockproteinen IbpA/IbpB identifiziert. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind in den Proteinsequenzen von (a) IbpA und (b) IbpB aus *E. coli* K-12 MG1655 rot markiert hervorgehoben.

GrpE effektiv funktioniert. Parsell und Sauer [112] konnten sogar zeigen, dass die Hitzeschockproteine direkt durch ungefaltetes Protein aktiviert werden und dass dafür nur die Konzentration des Proteins das entscheidende Signal ist und nicht etwa seine Abbauprodukte. Man geht davon aus, dass durch die Assoziation von IbpA/IbpB mit aggregierten Proteinen die hydrophoben intra- und intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen verringert werden. Das führt zu den beobachteten kleineren *inclusion bodies*, aus denen die Proteine im Anschluß leichter durch ClpB-DnaK-DnaJ-GrpE renaturiert werden können.

Der Unterschied in der Aktivierung von IbpA/B durch die verschiedenen YscV Expressionskonstrukte könnte in einer unterschiedlichen Stabilität liegen. Das Vollängenkonstrukt ist aufgrund der N-terminalen Transmembrandomäne ohnehin vollkommen unlöslich. Und möglicherweise verhält sich der verkürzte C-terminus YscV_{c378} instabiler als der vollständige YscV_{c326}. Zusätzlich zeigte HisYscV_{c378} immer ein höheres Expressionniveau als HisYscV_{c326}. Durch eine erhöhte Instabilität und Proteinkonzentration kommt es auch zu einer schnelleren Aggregation und damit zu einer erhöhten zellulären Konzentration an aggregiertem Protein. Dies könnte zu der beobachteten differentiellen IbpA/B Aktivierung geführt haben.

Interessant ist die Fragestellung, ob das IbpAB System, welches auch in *Yersinia* vorkommt, möglicherweise generell zur Stabilisierung von YscV beiträgt. Daten hierzu könnten auch den Mechanismus der Insertion von YscV in die innere Membran genauer beleuchten. Bisher sind keine spezifischen Chaperonsysteme bekannt, welche für den Membraneinbau von YscV verantwortlich sind. Es könnte daher auch ein generelles Chaperonsystem in Frage kommen, welches sowohl die Stabilisierung als auch die Membraninsertion von YscV übernimmt.

3.2.6 Koexpression von YscV_c mit molekularen Chaperonen

Aufgrund der nachgewiesenen Aktivierung der Hitzeschockproteine IbpA/B wurde in Erwägung gezogen, HisYscV_c mit Chaperonen zu koexprimieren, weil die Aktivität dieser Hitzeschockproteine *in vivo* eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Proteinfaltung durch das DnaKJ-GrpE System ist [102].

Viele neu synthetisierte Proteine benötigen die Assistenz von Chaperonen, um sich in ihre native Konformation falten zu können. Besonders bei rekombinant produzierten Proteinen ist die Tendenz zur Aggregation oft der limitierende Faktor bei der Proteinproduktion. Das Resultat sind Proteindegradation und die Produktion von *inclusion bodies*. Diesen unerwünschten Effekt kann man in einigen Fällen durch gemeinsame Expression mit Chaperonen umgehen. Sie fördern die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine und erhöhen dadurch deren Löslichkeit und Aktivität. Für die Koexpressionsversuche wurden die Chaperon Systeme DnaKJ-GrpE und GroEL-GroES getestet. Sie sind Mitglieder zweier großer Familien von Chaperonen, die in *E. coli* essentiell für die Faltung zytoplasmatischer Proteine sind: die Hsp70 (DnaKJ-GrpE) und die Hsp60 (GroEL-GroES) Familien. DnaKJ und GrpE binden an naszierende Polypeptidketten und verhindern dadurch eine vorzeitige Faltung oder Aggregation. GroEL-GroES dagegen sind für die posttranslationale Faltung von Proteinen wichtig und katalysieren die Faltung der Proteine in ihre endgültige native Konformation. Arbeiten haben gezeigt, dass GroEL und GroES essentiell für die Lebensfähigkeit von *E. coli* unter diversen Wachstumsbedingungen sind [44] und dass sie sowohl für die initiale Faltung als auch die Aufrechterhaltung der Konformation von ca. 10 % der *E. coli* Proteine wichtig sind [63].

Die Koexpressionsexperimente wurden trotz der vermuteten höheren Instabilität mit der verkürzten zytoplasmatischen Domäne YscV_{c378} durchgeführt. Grund dafür war die Annahme, dass das Vorhandensein von IbpAB in den *inclusion bodies* von YscV_{c378} die Reaktivierung durch die koexprimierten Chaperone fördern würde. Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). Die Induktion von DnaKJ-GrpE und GroEL-ES erfolgte nach einem etablierten Protokoll mit 10 mg/ml Arabinose bzw. 20 ng/ml Tetracyclin bei einer OD₆₀₀ = 0.6-0.8 [111]. Nach 30 min. wurde die Expression von HisYscV_{c378} durch Zugabe von 0.01 mM IPTG induziert. Abbildung 3.10a zeigt die Pilot-Koexpression von DnaKJ-GrpE, GroEL-GroES und HisYscV_{c378} im Fermenter in einem zeitlichen Fenster von 0-5 h nach Expressionsinduktion. Drei Stunden nach Induktion sind alle Chaperone im Überstand des Zelllysates zu finden (Abb. 3.10a, Spur 6). Eine mit Coomassie-Färbung nachweisbare HisYscV_{c378} Bande war allerdings nur im Sediment des Zelllysates zu finden (Abb. 3.10a, Spur 1-3). Daher wurde die Löslichkeit von HisYscV_{c378} nach Chaperon-Koexpression mittels Western Blot überprüft (Abb. 3.10c) und mit der Löslichkeit von YscV_{c378} ohne Chaperon-Koexpression (Abb. 3.10b) verglichen. Die Induktion der Chaperone erfolgte unter den oben erwähnten Bedingungen. Die Induktion von

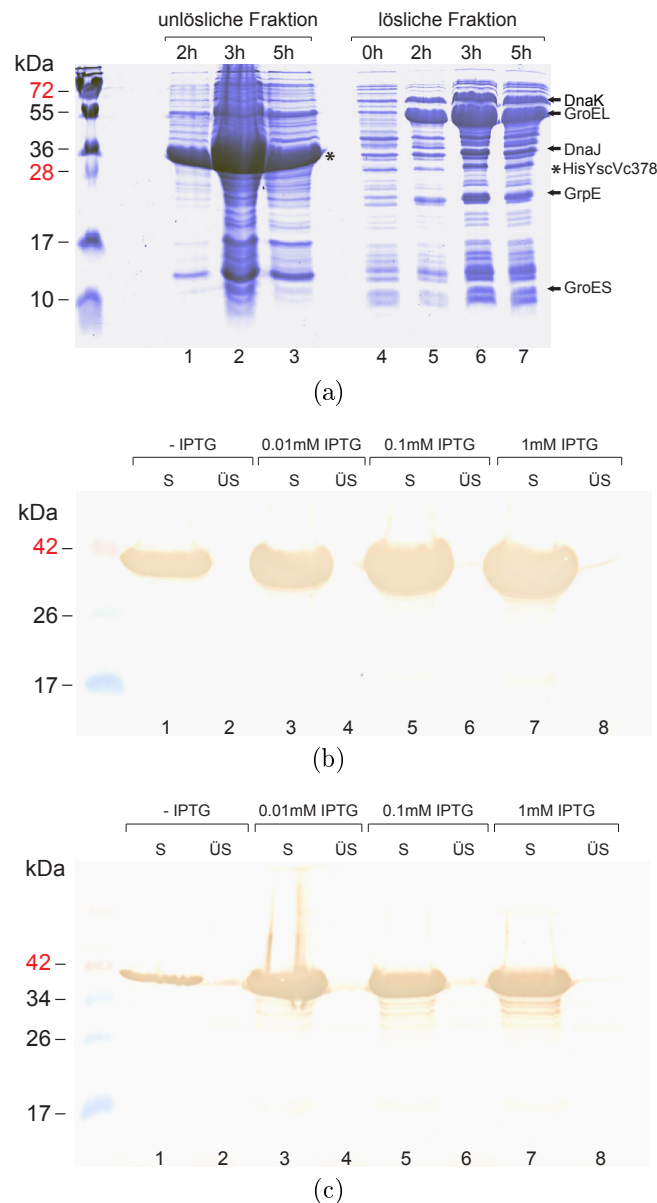


Abbildung 3.10: Koexpression von HisYscV_{c378} mit den Chaperon Systemen DnaKJ-GrpE und GroEL-ES

(a) Coomassie-gefärbtes 15 % SDS-Gel. Pilotversuch zur Evaluierung der Expressionsfähigkeit der Chaperone und der Löslichkeit von HisYscV_{c378}. Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Vor der Expressionsinduktion (0h) und 2h, 3h und 5h danach wurden je eine Probe der Expressionskultur geerntet und die lösliche und unlösliche Fraktion des Zelllysates im SDS-Gel aufgetrennt. Alle exprimierten Chaperone finden sich in der löslichen, zytosolischen Fraktion wieder. HisYscV_{c378} (Sternchen) ist nur in den unlöslichen Fraktionen zu detektieren. (b) Western Blot mit anti-YscV Serum. Expression von HisYscV_{c378} im 1.3 L Fermenter. (c) Western Blot mit anti-YscV Serum. Co-Expression von HisYscV_{c378} mit DnaKJ-GrpE und GroEL-ES im 1.3 L Fermenter.

S Sediment nach Zellyse und Zentrifugation, ÜS löslicher Überstand nach Zellyse und Zentrifugation

HisYscV_{c378} erfolgte mit 0.01 mM, 0.1 mM und 1 mM IPTG. Nach 3 h Expression wurden die Kulturen geerntet, auf $OD_{600} = 0.6$ eingestellt und Zellüberstände und

-sedimente im Western Blot auf die Anwesenheit von HisYscV_{c378} überprüft. Bei Expression von HisYscV_{c378} alleine findet ohne IPTG-Induktion bereits eine starke basale Transkription statt (Abb. 3.10b, Spur 1). Unabhängig von der Stärke der IPTG-Induktion fällt das Protein vollständig aus und ist nur im Zellsediment zu detektieren (Abb. 3.10b, Spur 1, 3, 5 und 7). Bei der Koexpression ist auffällig, dass die basale Transkription deutlich niedriger und die Gesamtmenge an produziertem HisYscV_{c378} verringert ist (Abb. 3.10c). Allerdings war HisYscV_{c378} nach Induktion mit 0.01 mM und 0.1 mM IPTG und im Ansatz ohne IPTG-Induktion als sehr feine Bande in den Zellüberständen zu detektieren (Abb. 3.10c, Spur 2, 4, 6).

Die geringen Mengen HisYscV_{c378}, welche nach der Koexpression mit DnaKJ-GrpE und GroEL-ES im Überstand der *E. coli* BL21 (DE3) Lysate detektiert werden konnten, wurden mittels IMAC zu reinigen und anzureichern versucht. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Aufreinigung über IMAC und ihre Verifizierung im Western Blot. HisYscV_{c378} konnte zwar gereinigt werden, allerdings nur in sehr geringen Mengen und das Verhältnis zwischen der Menge an HisYscV_{c378} und unspezifischen Proteinen war sehr schlecht.

Außerdem war auffällig, dass HisYscV_{c378} nahezu über den gesamten Imidazol-Gradienten eluierte und dass sich das Elutionsverhalten bei jeder Aufreinigung unterschied. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es noch mit Chaperonkomponenten assoziiert war und dadurch keine einheitliche Affinität zur Säulenmatrix besaß. Um diese Annahme zu überprüfen und die möglichen Komplexe aus HisYscV_{c378} und Chaperonen zu dissoziieren, wurde ein Teil des Aufreinigungsansatzes mit 10 mM ATP und 10 mM MgCl₂ bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Aktivität der Chaperone ist ATP-abhängig, daher sollte die Zugabe von ATP die Dissoziation der Komplexe fördern. Beide Ansätze, der Ansatz ohne ATP-Zugabe und der Ansatz mit ATP- und MgCl₂-Zugabe, wurden anschließend auf einer analytischen Gelfiltrationssäule analysiert. Bei einer erfolgreichen ATP-abhängigen Dissoziation der Komplexe aus HisYscV_{c378} und Chaperonen sollten mehrere kleinere Proteinkomplexe entstehen, welche im Vergleich zu dem Ansatz ohne ATP-Zugabe ein verändertes Elutionsmuster in der Gelfiltration aufweisen. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Elutionsprofilen beider Ansätze detektiert werden. Entweder war also die Dissoziation nicht erfolgreich oder die angenommene Assoziation zwischen HisYscV_{c378} und den Chaperonen lag nicht vor.

Da diese Methode zur Reinigung von HisYscV_c keine Aussicht auf ausreichend homogenes Material versprach, wurde sie nicht weiter optimiert.

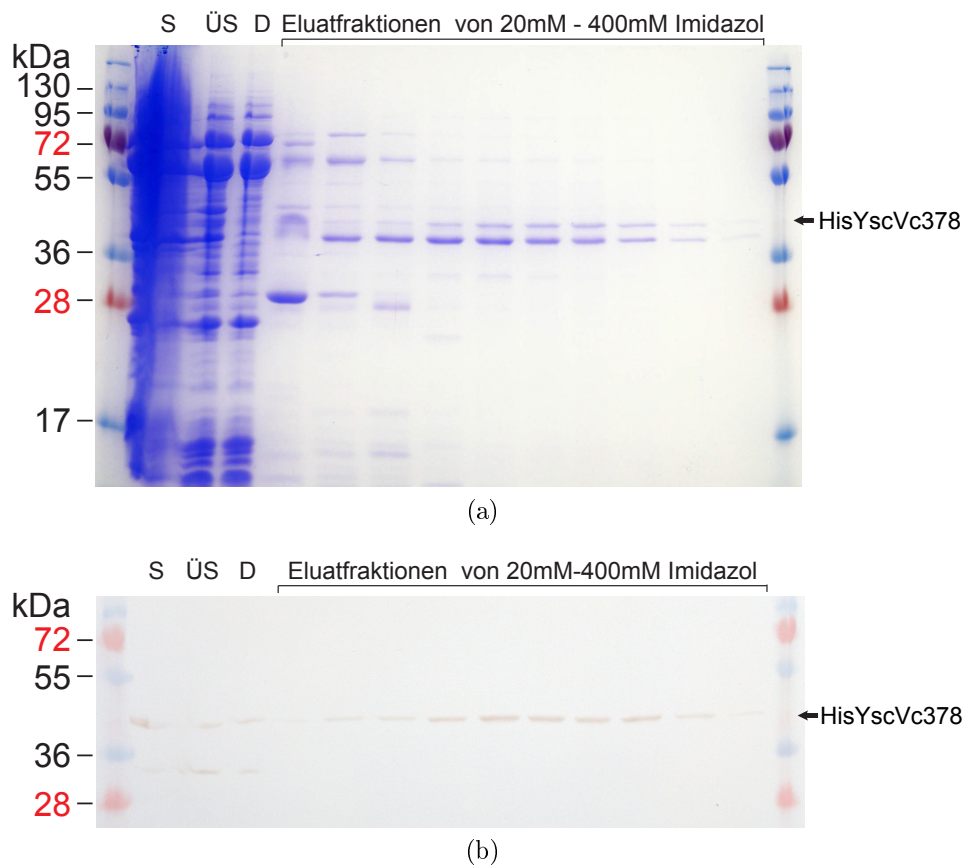


Abbildung 3.11: Affinitätschromatografische Reinigung von löslichem HisYscV_{c378} nach Koexpression mit DnaKJ-GrpE und GroEL-ES

Die Aufreinigung erfolgte mit einer HisTrap HP (5ml) Säule. Gebundenes HisYscV_{c378} wurde mit einem Imidazolgradienten von 20 mM- 400 mM Imidazol eluiert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden gesammelte Fraktionen entlang des gesamten Imidazolgradienten im (a) Coomassie-gefärbten 15 % SDS-Gel und im (b) Western Blot mit anti-YscV Serum auf das Vorhandensein von HisYscV_{c378} analysiert.

S unlösliches Sediment nach Zellyse und Zentrifugation, ÜS löslicher Überstand nach Zellyse und Zentrifugation, D Durchlauf, ungebundene Fraktion nach Säulenbeladung

3.2.7 Reinigung von YscV_c als MBP-Fusionsprotein

Da die Rückfaltung von YscV_c aus *inclusion bodies* und die Koexpression mit Chaperonen nicht erfolgreich war, wurde YscV_c als Fusion mit einem MBP-Tag produziert, um die nötige Löslichkeit für eine effiziente Aufreinigung zu erreichen. Die Expression von unlöslichen Proteinen als Fusion mit einem Löslichkeit-vermittelnden Proteintag kann in vielen Fällen die Bildung von *inclusion bodies* reduzieren und stellt somit eine mögliche Alternative zur Rückfaltung dar. Die größten Nachteile bei der Rückfaltung sind die Notwendigkeit einer Zeit-aufwendigen Etablierung und Optimierung einer Rückfaltungsstrategie und eine oft zu geringe Ausbeute. Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Löslichkeit-vermittelnden Tags, doch am gebräuchlichsten sind MBP (Maltose-Binde-Protein), GST (Glutathion-S-Transferase), Trx (Thioredoxin) und NusA (N-Utilization-substance). MBP und GST haben den Vorteil, dass sie zusätzlich als Affinitäts-Tag genutzt werden können [39]. MBP hat sich aber als deutlich effektiverer Löslichkeitsvermittler erwiesen [73] und ist daher ein häufig genutzter Tag.

3.2.7.1 Klonierung

Für die Expression von YscV mit einem N-terminalen MBP-Tag wurde erneut eine vollständige und eine verkürzte Variante der zytoplasmatischen Domäne von YscV kloniert. Für die Amplifizierung der vollständigen zytoplasmatischen Domäne YscV_{c326} wurde das Primerpaar MBPYscV_{c326}-for/MBPYscV_c-rev verwendet. Die Amplifizierung der verkürzten zytoplasmatischen Domäne YscV_{c378} erfolgte mit den Primern MBPYscV_{c378}-for und MBPYscV_c-rev. Über die beiden *forward*-Primer wurden Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRI eingeführt und über den gemeinsamen *reverse*-Primer wurde eine Schnittstelle für SalI eingeführt. Sie dienten der anschließenden Klonierung beider Amplifikate in den Vektor pMAL-c2x (Abb. 3.12). Die Amplifizierung erfolgte an genomischer DNA von *Y. enterocolitica* WA-314. Die korrekte Sequenz der positiven Klone wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die konstruierten Plasmide, welche MBP-YscV_{c326} bzw. MBP-YscV_{c378} als Fusionen enthielten, wurden als pMBPYscV_{c326} bzw. pMBPYscV_{c378} bezeichnet. Durch die Klonierung in pMAL-c2x wurde außerdem eine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa zwischen MBP-Protein und den Fusionsproteinen YscV_{c326} bzw. YscV_{c378} eingeführt. Darüber sollte nach erfolgreicher Aufreinigung der beiden Fusionsproteine der MBP-Tag wieder abgespalten werden. Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch die abgeleitete Aminosäuresequenz für pMBPYscV_{c326} nach Klonierung in pMAL-c2x. Die Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein resultiert in einem theoretischen Molekulargewicht der Proteine von 86 kDa für MBPYscV_{c326} und 81 kDa für MBPYscV_{c378}.

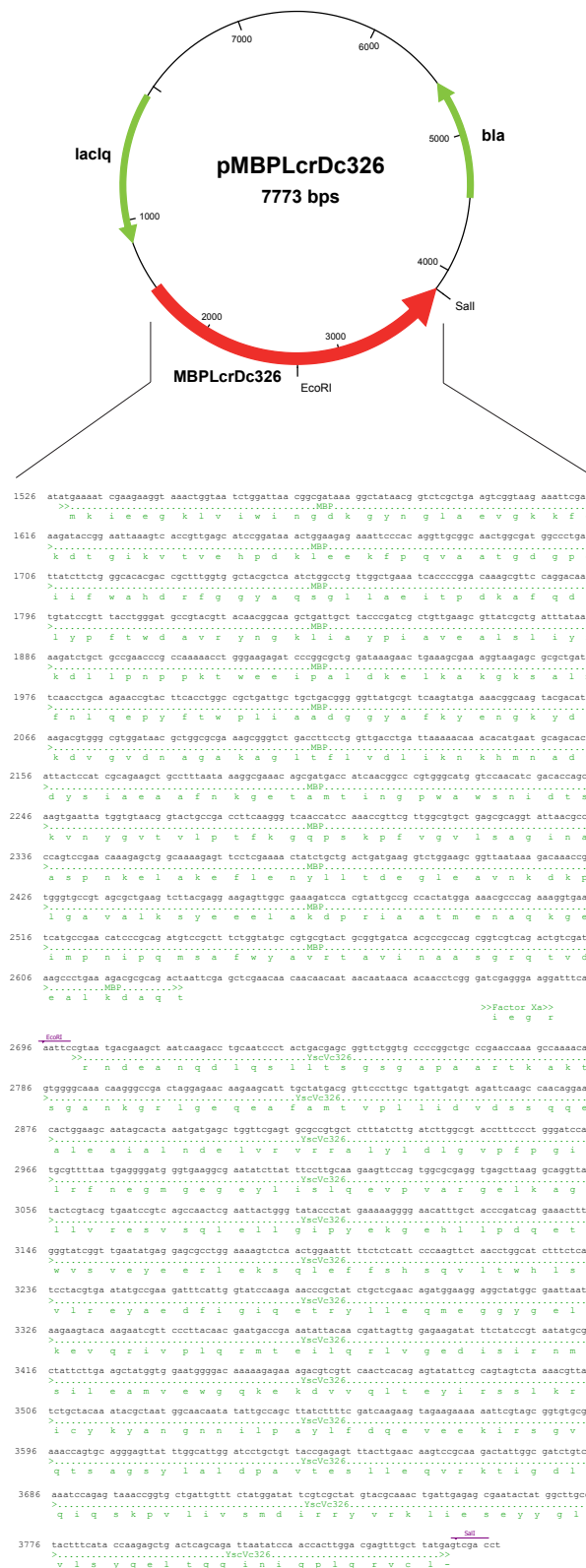


Abbildung 3.12: Konstruktion des Plasmids pMBPYscV_{c326}

Sequenz der vollständigen zytoplasmatischen Domäne YscV_{c326} mit N-terminaler MBP-Fusion. Die Sequenz für YscV_{c326} wurde über die Restriktionsenzyme EcoRI und Sall in den Vektor pMALc-2x kloniert und so C-terminal an die Sequenz für das Maltose-Bindeprotein (MBP) fusioniert. Die resultierende translatierte Proteinsequenz ist grün dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind lila markiert. Die Konstruktion von pMBPYscV_{c378} erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

lacI Lac-Repressor, *bla* β -Lactamase Enzym

3.2.7.2 Expression und Reinigung

Die Expression beider Konstrukte erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Um die Expressionsbedingungen zu optimieren, wurde die Löslichkeit beider Proteine bei Anzuchttemperaturen von 37°C, 27°C und 18°C verglichen. Hierfür wurden je 3 parallele Kulturen bei einer $OD_{600} = 0.5$ mit 0.1 mM IPTG induziert und bei 37°C, 27°C und 18°C exprimiert. Nach 3 h wurden die Kulturen auf $OD_{600} = 0.6$ eingestellt, 2 ml geerntet und Überstände und Zellsedimente in der SDS-PAGE verglichen (Abb.3.13). Beide Proteine zeigten eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit. Bei einer Expressionstemperatur von 37°C war MBPYscV_{c326} noch vollständig unlöslich, während bei 18°C fast das gesamte exprimierte Protein in Lösung vorlag. MBPYscV_{c378} dagegen zeigte bei 18°C zwar eine erhöhte Löslichkeit im Vergleich zu 37°C, ein großer Anteil an exprimiertem Protein lag jedoch immer noch als unlösliches Aggregat vor. Dieses einfache Experiment deutete auf einen Unterschied in der Stabilität von MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} hin. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Expressionen bei einer Temperatur von 18°C und wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben durchgeführt. Die Reinigung der MBP-Fusionskonstrukte erfolgte

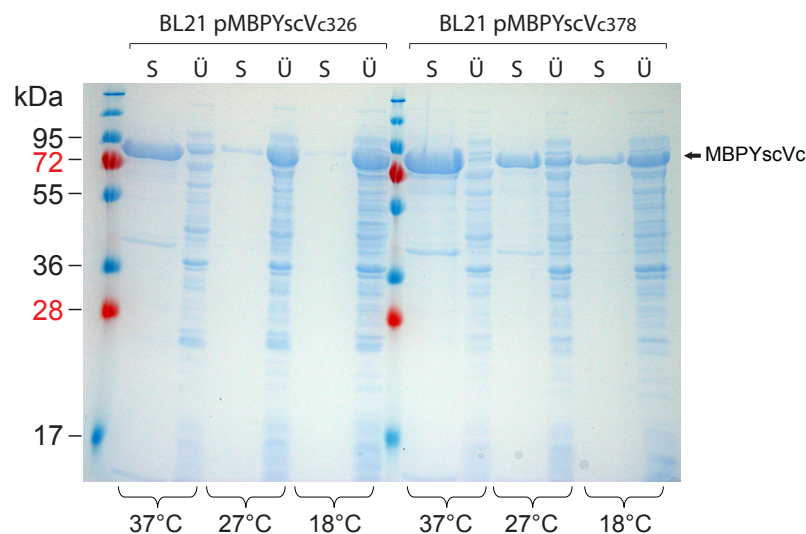


Abbildung 3.13: Evaluierung der optimalen Expressionstemperatur für MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Coomassie-gefärbtes 15 % SDS-Gel. pMBPYscV_{c326} und pMBPYscV_{c378} wurden für 3 h in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS bei 37°C, 27°C und 18°C exprimiert. Anschließend wurden die Kulturen auf $OD_{600} = 0.6$ eingestellt, die Zellen geerntet und lysiert. S unlösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation, Ü lösliche Zellfraktion nach Zellaufschluß und Zentrifugation.

affinitätschromatografisch über eine Dextrin-gekoppelte Sepharose-Säule. Anschließend wurden die Fraktionen, welche MBPYscV_{c326} bzw. MBPYscV_{c378} enthielten, vereint und umpuffered. Das Umpufferen diente der Entfernung der Maltose aus der Lösung. Abbildung 3.14 gibt einen Überblick über die Aufreinigung und anschließende Umpufferung von MBPYscV_{c326} (Abb.3.14a) und MBPYscV_{c378} (Abb.3.14b).

Anschließend wurden die Reinigungsschritte im Western Blot analysiert und die gereinigten Proteinbanden mit einem MBP- und YscV-Antikörper als MBPYscV verifiziert (Abb. 3.14c und d, gezeigt ist jeweils der Western Blot mit anti-YscV Serum).

Aus einem Liter Bakterienkultur konnten 75-100 mg MBPYscV_{c326} mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen werden. Die Ausbeute und Reinheit von MBPYscV_{c378} war mit 20-35 mg pro 1 L Bakterienkultur und ungefähr 80 % deutlich geringer. Dies lag nicht nur an einer geringeren Expressionseffizienz, sondern vor allem an einer geringeren Löslichkeit des Proteins (vgl. Abb. 3.14a, Spur 1-2 und 3.14b, Spur 1-2).

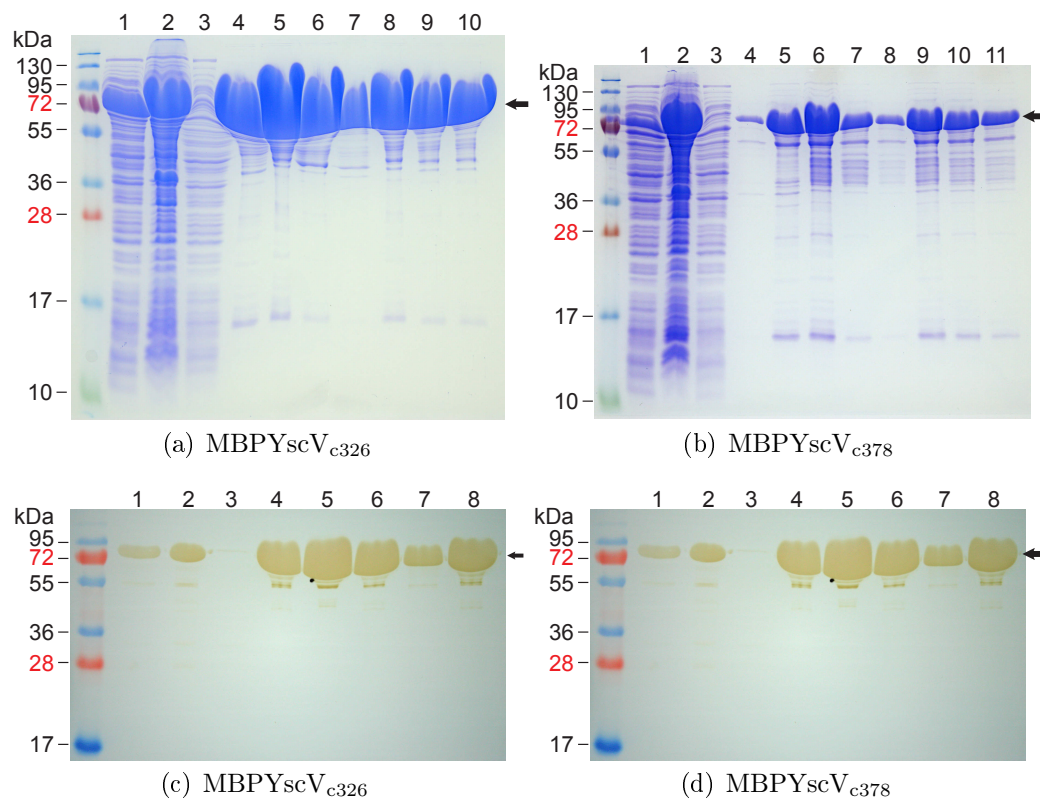


Abbildung 3.14: Affinitätschromatografische Reinigung von MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} über MBPTrap HP (5 ml)

(a) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 1 Zellysat, lösliche Fraktion, 2 Zellysat, unlösliche Fraktion, 3 Säulendurchlauf, 4-7 gesammelte Fraktionen nach Elution, 8 Pool der gesammelten Fraktionen nach Elution, 9 nach Umpufferung auf Tris-Puffer, 10 nach Umpufferung auf HEPES-Puffer (b) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 1 Zellysat, lösliche Fraktion, 2 Zellysat, unlösliche Fraktion, 3 Säulendurchlauf, 4-8 gesammelte Fraktionen nach Elution, 9 Pool der gesammelten Fraktionen nach Elution, 10 nach Umpufferung auf Tris-Puffer, 11 nach Umpufferung auf HEPES-Puffer (c) Western Blot mit anti-YscV Serum. 1 Zellysat, lösliche Fraktion, 2 Zellysat, unlösliche Fraktion, 3 Säulendurchlauf, 4-7 gesammelte Fraktionen nach Elution, 8 Pool der gesammelten Fraktionen nach Elution (d) Western Blot mit anti-YscV Serum. 1 Zellysat, lösliche Fraktion, 2 Zellysat, unlösliche Fraktion, 3 Säulendurchlauf, 4-8 gesammelte Fraktionen nach Elution, 9 Pool der gesammelten Fraktionen nach Elution

Der Pfeil markiert MBPYscV_{c326} bzw. MBPYscV_{c378}

Nach der Aufreinigung sollte MBP abgespalten werden. Zu diesem Zweck war bei

der Klonierung zwischen MBP und der jeweiligen YscV_c-Domäne eine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa eingefügt worden (Abb. 3.12). Durch die Spaltung entstehen MBP mit dem Rest der Linker-Domäne am C-Terminus (ca. 42 kDa) und YscV_c mit 4 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren (YscV_{c326} ca. 43 kDa und YscV_{c378} ca. 38 kDa). Abbildung 3.15 zeigt das Ergebniss des Faktor Xa-Verdaus von MBPYscV_{c326} nach einer Inkubationszeit von 2, 6 und 24 h bei 23 °C. Nach jeder der drei Inkubationszeiten wurden die Ansätze zentrifugiert, Überstände und Sedimente in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 3.15a) bzw. mit anti-YscV (Abb. 3.15b) und anti-MBP (Abb. 3.15c) Antikörpern detektiert. Bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h war nahezu das gesamte eingesetzte Fusionsprotein gespalten (vgl. mit Abb. 3.15 Spur 1, vor Verdau), der Verdau war also sehr effektiv. Genauso verhielt sich MBPYscV_{c378} (Daten nicht gezeigt).

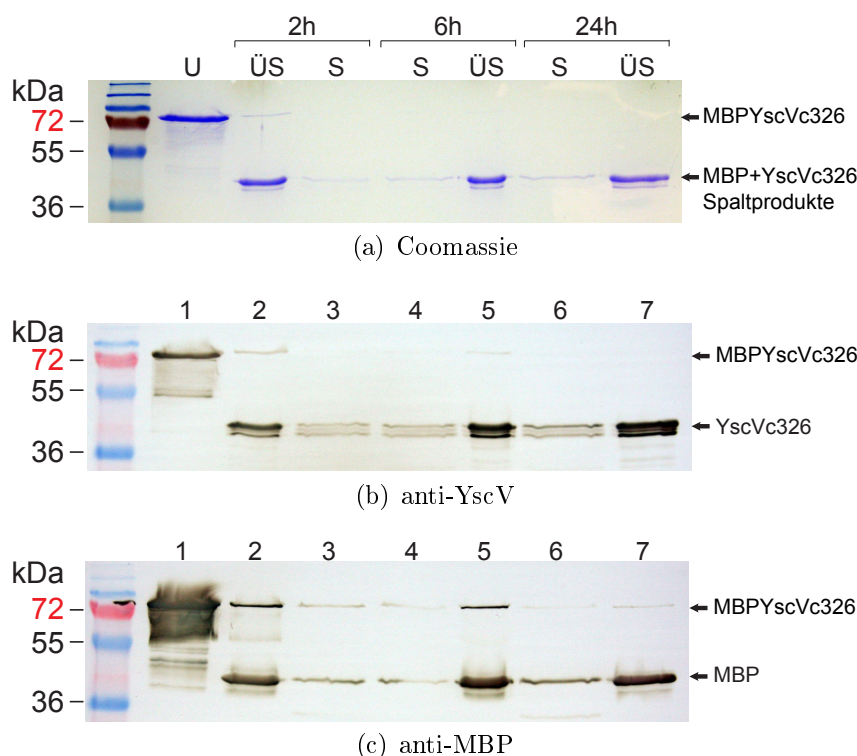


Abbildung 3.15: Faktor Xa Verdau von MBPYscV_{c326} zur Entfernung des N-Terminalen MBP-Tag

Gereinigtes MBPYscV_{c326} wurde für 2 h, 6 h und 24 h mit Faktor Xa Protease inkubiert und die Effizienz des Verdaus anschließend in der SDS-PAGE verglichen (a) Coomassie-gefärbtes 15 % SDS-Gel (b) Western Blot mit anti-YscV Serum (c) Western Blot mit anti-MBP Antikörper

U unverdautes MBPYscV_{c326}, ÜS löslicher Überstand nach Faktor Xa Verdau und Zentrifugation, S aggregiertes Sediment nach Faktor Xa Verdau und Zentrifugation

Die Abbauprodukte mußten in einem zweiten Reinigungsschritt voneinander getrennt werden. Dafür wurde erneut eine affinitätschromatografische Reinigung über Dextrin-gekoppelte Sepharose genutzt, weil sich eine Größenauftrennung der Abbauprodukte

produkte mittels Gelfiltration aufgrund der nahezu identischen Molekulargewichte von MBP (ca. 42 kDa) und YscV_c (ca. 43 kDa bzw. 38 kDa) nicht realisieren ließ. In der Affinitätsreinigung sollte ungespaltenes Fusionsprotein und MBP erneut durch die Säule gebunden werden und die gespaltenen YscV_c-Varianten im Durchlauf aufgefangen werden. Die gespaltenen MBP Moleküle wurden aber nicht mehr effektiv durch die Säule gebunden und ein großer Anteil befand sich in der Durchlaufraktion. Außerdem ließen sich MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} nach der Aufreinigung nur noch in Spuren im Western Blot detektieren (Daten nicht gezeigt). Das könnte andeuten, dass das Protein nicht in seiner nativen Konformation vorliegt und nur durch die Fusion an MBP in Lösung gehalten wird. Oder es war zwar korrekt gefaltet, benötigte aber weitere Wechselwirkungspartner oder eine andere biophysikalische Umgebung, um stabil in Lösung zu bleiben. Daher war es nötig, die weiteren funktionellen und strukturellen Analysen mit den ungespaltenen Fusionsproteinen durchzuführen.

3.3 Strukturelle Charakterisierung von YscV_c

Bisher ist nicht bekannt, in welchem Bereich des Basalkörpers die Komponenten des Exportapparates lokalisiert sind und vor allem in welcher Stöchiometrie sie vorliegen. Wie in der Einleitung (Abschn. 1.4.4.4) bereits erklärt wurde, geht man davon aus, dass zumindest einige Komponenten des Exportapparates im Inneren der Membranringe, bestehend aus YscD und YscJ, lokalisiert sind und als Becher-förmige Struktur zur zytoplasmatischen Seite hinausragen [95, 2]. Man geht davon aus, dass die einzelnen Komponenten als Monomere bzw. maximal Dimere vorliegen, da der Platz für größere Oligomere im Inneren der Membranringe nicht ausreichen würde. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde der Oligomerisierungsgrad der gereinigten MBP-Fusionsproteine mithilfe der analytischen Gelfiltration und verschiedener Nativ-PAGE Verfahren analysiert. Weiterhin sollte mithilfe von Kleinwinkelstreuung (SAXS) - Analysen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine erste Vorstellung über die Konformation von YscV_c und möglicher oligomerer Komplexe gewonnen werden.

3.3.1 MBPYscV_c assembliert zu oligomeren Komplexen

Die Analyse des Oligomerisierungszustandes erfolgte vergleichend mithilfe der analytischen Gelfiltration, der Nativ-PAGE und der *BlueNative*(BN)-PAGE.

Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration bietet den Vorteil, dass die Analyse in unterschiedlichen Puffersystemen und damit unter nahezu physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann. Durch die Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter Größe kann die Größe vorliegender Oligomere in der analysierten Probe abgeschätzt werden. Die

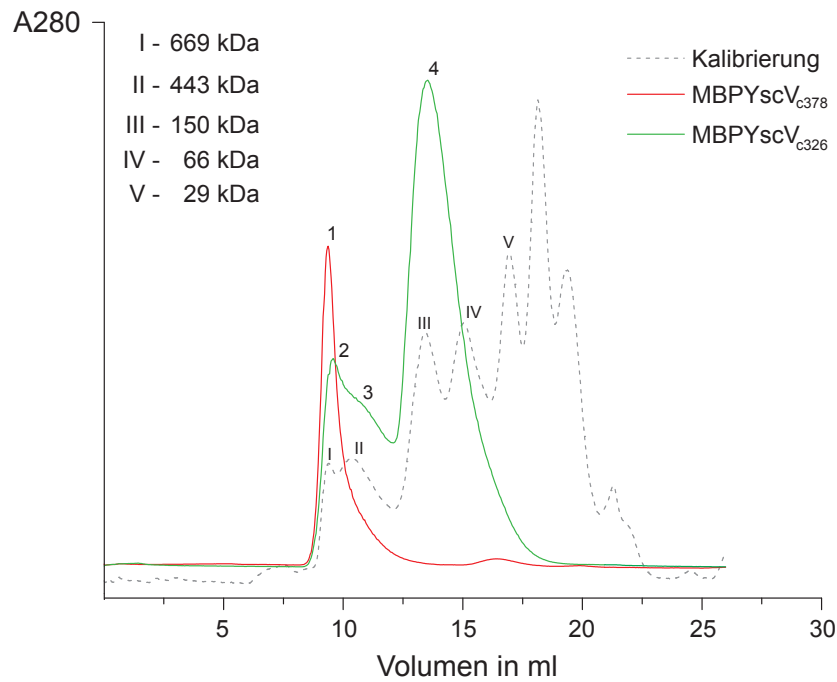
Gelfiltrationsanalysen wurden zunächst mit der analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL durchgeführt, welche einen optimalen Auftrennungsbereich von 10-600 kDa besitzt. Die Säule wurde mit Proteinen bekannter Größe von 30 kDa-700 kDa kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte im gleichen Elutionspuffer, wie die anschließende analytische Gelfiltration. Es wurden Tris-, HEPES- und Phosphat-Puffer (vgl. Abschn. 2.9.5) miteinander verglichen, um einen möglichen Einfluß der Pufferbedingung auf die Oligomerisierung auszuschließen. Alle drei Puffer zeigten das gleiche Elutionsprofil für MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326}. In Abbildung 3.16 sind repräsentativ das Ergebnis der Gelfiltration in Phosphat-Puffer (Abb. 3.16a) und die korrespondierenden SDS-Gele für MBPYscV_{c378} (Abb. 3.16b) und MBPYscV_{c326} (Abb. 3.16c) gezeigt.

Besonders auffällig ist, dass sich beide Elutionsprofile deutlich unterscheiden.

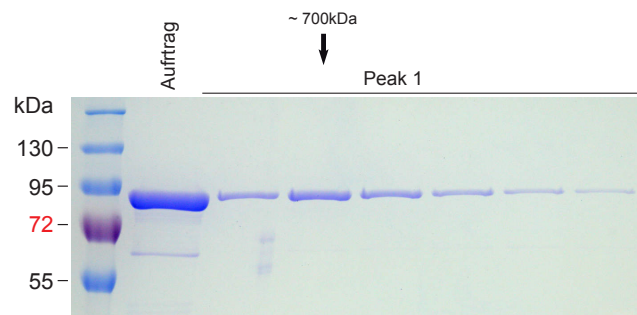
MBPYscV_{c378} eluiert in einem einzigen, scharfen Peak (Peak 1) bei ca. 700 kDa. Bei einem Molekulargewicht des Monomers von 81 kDa könnte dies einem Oktamer, Nonamer oder Dekamer entsprechen.

MBPYscV_{c326} eluierte in 3 Größenpopulationen, welches sich in ihrer Intensität unterscheiden. Die ersten beiden Größenpopulationen eluierten als Peak mit einer Schulter (in der Abbildung bezeichnet mit 2 und 3) zwischen 300-700 kDa, mit zwei Absorptionsmaxima bei ca. 440 kDa und 700 kDa. Bei einem Molekulargewicht des Monomers von 86 kDa könnten diese Größenpopulationen vermutlich Hexamere (3) oder Oktamere (2) repräsentieren. Es könnte aber auch sein, dass sich ein Gleichgewicht aus verschiedenen oligomeren Zuständen von MBPYscV_{c326} dahinter verbirgt. Dies läßt sich jedoch mit der Gelfiltration nicht genauer beantworten. Der dritte Peak, welcher die größte Absorptionsintensität aufweist, eluierte etwa bei 150 kDa. Er repräsentiert also vermutlich vor allem eine dimere Population (170 kDa). Der Peak ist aber so breit, dass sich dahinter zusätzliche monomere, trimere und tetramere Subpopulationen verbergen könnten. Die Unterschiede in den Absorptionsintensitäten spiegeln sich auch sehr gut in den Proteinmengen der einzelnen Elutfraktionen im SDS-Gel wider (Abb. 3.16c).

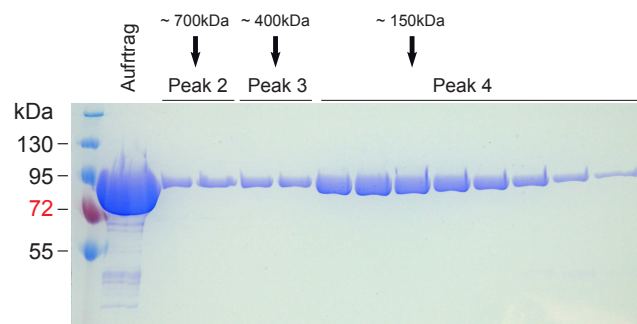
Da die größten identifizierten Komplexe von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c378} im Bereich des Ausschlussvolumens der Superdex 200 Säule bei etwa 700 kDa eluierten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich teilweise um aggregiertes Protein handelte. Daher wurden beide Proteine auf einer hochauflösenden Superose 6 Gelfiltrationssäule analysiert, welche Proteinkomplexe bis 5 MDa auftrennt. Die Analyse bestätigte, dass beide Proteine heterogene, oligomere Komplexe bilden und sich in ihrem Oligomerisierungsgrad unterscheiden. Die MBP-Fusion der verkürzten zytoplasmatischen Domäne verhält sich relativ homogen und eluiert bei ca. 700 kDa. Im Vergleich dazu liegt MBPYscV_{c326} als sehr heterogenes Gemisch oligomerer Komplexe mit einem Größenbereich von 150 kDa- 700 kDa vor (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte, dass die großen Komplexe echte Multimere sind und keine aggregierten Strukturen.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.16: Analyse des Oligomerisierungsgleichgewichtes von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} mittels analytischer Gelfiltration

(a) Chromatogramme der Säulenkalibrierung und der Gelfiltrationsläufe von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} und korrespondierendes Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von (b) MBPYscV_{c378} und (c) MBPYscV_{c326}

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte in 20 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5. Die einzelnen Proteinpeaks im Chromatogramm des Kalibrierungslaufes sind mit römischen Zahlen versehen, denen die korrespondierenden Größen zugeordnet sind. Den Proteinpeaks in den Chromatogrammen von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} sind arabische Zahlen zugeordnet, die der Zuordnung zu den korrespondierenden Spuren in der SDS-PAGE dienen.

In einem ersten Resümee kann festgehalten werden, dass die zytoplasmatische Domäne Wechselwirkungen mit sich selbst eingeht und in einem dynamischen Oligomerisierungsgleichgewicht vorliegt, welches vermutlich ein Oligomergemisch vom Dimer bis zum Dekamer umfasst. Die anschließenden Nativ-PAGE und *BlueNative*-PAGE Analysen sollten daher Aufschluß darüber geben, ob sich hinter dem Elutionsprofil beider MBP-Fusionsproteine definierte oligomere Komplexe verbergen.

Nativ-PAGE

In der Nativ-PAGE werden native Proteine und Proteinkomplexe nach ihrem individuellen Masse-/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Das ermöglicht die Darstellung von Wechselwirkungen, erlaubt aber nicht die Abschätzung der Molekulargewichte von Proteinkomplexen. Daher wird bei der Durchführung einer Nativ-PAGE auf die Verwendung eines Größenstandards verzichtet. Die Nativ-PAGE erfolgte in einem 6 %-igen Nativgel auf HEPES-Puffer Basis. Es wurden jeweils 10 µg MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} eingesetzt, welche in HEPES-Puffer aufgereinigt worden waren und 10 µg MBP, welches auf HEPES-Puffer umgepuffert worden war. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.17a gezeigt.

MBP migrierte als eine einzige Größenspezies, deren Größe jedoch nicht bestimmt werden kann (Abb. 3.17a, Spur 1). MBPYscV_{c326} zeigte ein erstaunlich definiertes Leiter-artiges Muster, bestehend aus mindestens 7-8 Größenpopulationen (Abb. 3.17a, Spur 3). Dieser Befund bestätigt die in der Gelfiltration beobachtete Inhomogenität von MBPYscV_{c326} und zeigt zusätzlich, dass es sich um definierte oligomere Zustände von MBPYscV_{c326} handelt. MBPYscV_{c378} verhält sich, wie auch in der Gelfiltration, deutlich homogener und migriert als vermutlich hochmolekularer Komplex (Abb. 3.17a, Spur 2).

BlueNative-PAGE

Die *BlueNative*-PAGE hat gegenüber der klassischen Nativ-PAGE den Vorteil, dass sie die Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteinkomplexe erlaubt. Dies wird durch das Coomassie im Probenpuffer und im Elektrophoresepuffer erreicht. Es lagert sich, ähnlich wie SDS, an die Proteine an und verleiht ihnen somit eine negative Ladung, was die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Die *BlueNative*-PAGE erfolgte in einem 4-16 %-igen Gel, welches Proteine mit einem Molekulargewicht von 15-1000 kDa auftrennt. Es wurden jeweils 20 µg MBPYscV_{c378}, MBPYscV_{c326} eingesetzt, welche in Tris-Puffer aufgereinigt worden waren und 20 µg MBP, welches auf Tris-Puffer umgepuffert worden war. Die Analyse der *BlueNative*-PAGE (Abb. 3.17b) erbrachte folgende Ergebnisse. MBPYscV_{c378} migriert als sehr scharf definierte und sehr eng beieinander liegende Doppelbande auf Höhe der 720 kDa Markerbande (Abb. 3.17b, Spur 2). Das bestätigt den Peak aus der Gelfiltration, welcher ebenfalls bei ca. 700 kDa eluierte. Allerdings kann nicht genau gesagt werden, ob sich dahinter zwei verschiedene oligomere Spezies (vermutlich Oktamer und Dekamer) oder verschiedene Konformere derselben Größenspezies verbergen.

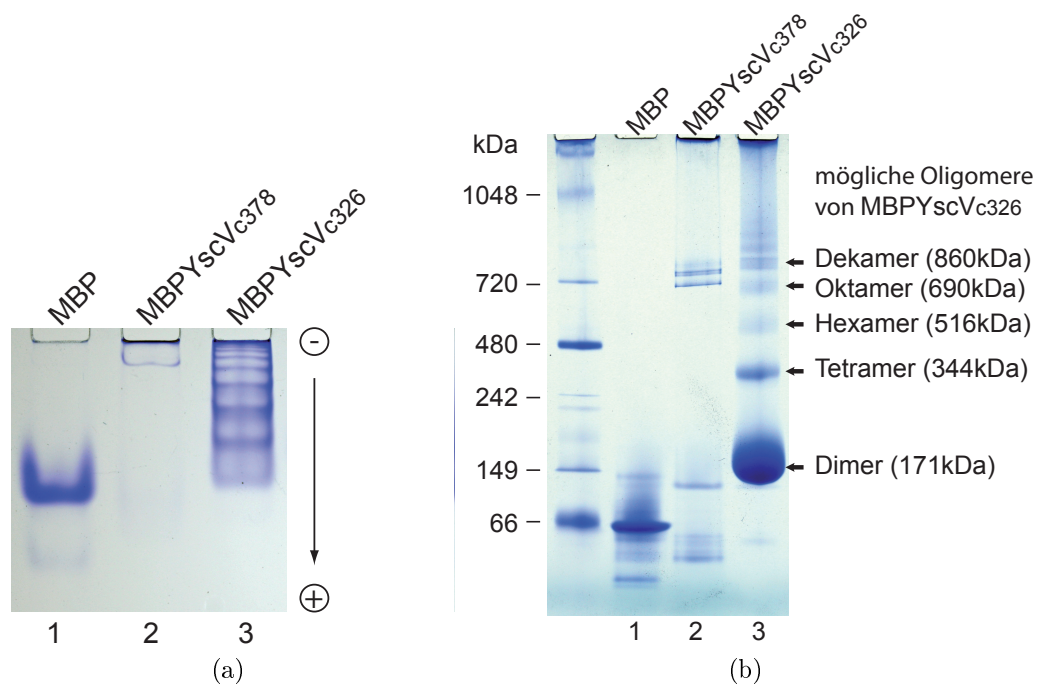


Abbildung 3.17: Analyse der Oligomerisierung von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} in der Nativ-PAGE

(a) Coomassie-gefärbtes 6 % HEPES Nativ-Gel, pH 7.4. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 90 min. auf Eis. Die angelegte Polung des elektrischen Feldes ist eingezeichnet. Es wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. (b) Coomassie-gefärbtes 4-16 % BlueNative-Gel. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 150 V für 105 min. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die theoretischen Molekulargewichte betragen: MBP 42 kDa (Monomer); MBPYscV_{c326} 86 kDa (Monomer), 170 kDa (Dimer), 344 kDa (Tetramer), 516 kDa (Hexamer), 690 kDa (Oktamer), 860 kDa (Dekamer), 1030 kDa (Dodekamer) und MBPYscV_{c378} 81 kDa (Monomer), 650 kDa (Oktamer), 810 kDa (Dekamer). Die den Proteinbanden zugewiesenen Molekulargewichte entsprechen MBPYscV_{c326}.

Das Bandenprofil der vollständigen zytoplasmatischen Domäne MBPYscV_{c326} sieht völlig anders aus (Abb. 3.17b, Spur 3). Es bestätigt, dass MBPYscV_{c326} (a) sehr inhomogen in Lösung vorliegt und (b) der größte Anteil bei ungefähr 150 kDa migriert und somit als Dimer vorliegt. Zusätzlich zeigt MBPYscV_{c326} ein ganz klar definiertes, Leiter-artiges Bandenmuster, welches sich bis deutlich über 700 kDa fortsetzt und sehr gut mit den Größen für eine tetramere (344 kDa), hexamere (516 kDa), oktamere (690 kDa) bzw. dekamere (860 kDa) Struktur übereinstimmt. Sehr interessant ist die Tatsache, dass offensichtlich keine ungeradzahligen Oligomerisierungszustände wie Monomere, Trimere, Pentamere, usw. vorhanden sind. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass das Dimer die kleinste Oligomerisierungseinheit bildet und in der fortschreitenden Assemblierung immer ein weiteres Dimer an ein bestehendes Oligomer angelagert wird. Das MBP-Protein migriert etwas schneller als die 66 kDa Markerbande (Abb. 3.17b, Spur 1). Es liegt somit, wie auch erwartet,

als Monomer vor und zeigt keine Oligomerisierungstendenz.

Somit lassen sich folgende Erkenntnisse zusammenfassen. Die beobachtete Oligomerisierung der Fusionsproteine findet über die zytoplasmatische Domäne von YscV_c statt und ist eine charakteristische Eigenschaft des Proteins. Sie wurde auch in einer Analyse einer Tag-freien Variante der zytoplasmatischen Domäne von YscV (AS 322-704) beobachtet. Nach Expression mit einem GST-Tag konnte die native zytoplasmatische Domäne von YscV durch Abspaltung vom GST-Tag gewonnen werden. Sie verhielt sich ebenso heterogen wie MBPYscV_{c326} und zeigte ein sehr dynamisches Gleichgewicht verschiedener Oligomerisierungszustände [172]. MBP liegt ausschließlich als Monomer vor. Aus der Literatur bzw. aus Kristallisationsstudien gibt es ebenfalls keine Hinweise auf eine Oligomerisierung dieses Proteins. Weiterhin erfolgt die Assemblierung autonom, da sie nicht von einem anderen Protein abhängig ist. Im Fall von MBPYscV_{c326} scheint sich immer ein Dimer an ein bestehendes Oligomer anzulagern, was ein erster Hinweis auf einen möglichen Assemblierungsmechanismus sein könnte.

3.3.2 MBPYscV_{c378} bildet stabile Ringstrukturen

Um herauszufinden, welche Strukturen sich hinter den verschiedenen oligomeren Komplexen von MBPYscV_{c378} und MBPYscV_{c326} verbergen, wurden beide Fusionsvarianten in der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Sevil Weinkauff und Dr. Nathalie Braun durchgeführt ². Dazu wurde das Verfahren der Negativkontrastierung angewendet (siehe Abschn. 2.12).

Abbildung 3.18a zeigt die TEM-Aufnahme einer negativ-gefärbten MBPYscV_{c326} Proteinpräparation. Die Aufnahme zeigt sehr deutlich, dass MBPYscV_{c326} bezüglich der Oligomergrößen sehr heterogen ist. Es sind sowohl sehr große Aggregat-ähnliche Komplexe zu erkennen, welche wenig strukturiert erscheinen, als auch kleinere, kompakte Komplexe (Abb. 3.18a, weiße Kreise). Die Gruppe der kleineren Komplexe wurde jedoch genauer analysiert. Mit 961 semi-manuell ausgewählten Einzelbildern wurden eine Translations- und Rotationsalignierung und Multivariate-Statistische-Analyse (MSA) durchgeführt. Die ersten 10 Eigenbilder und charakteristische Klassen, welche diese Analyse ergab, sind in Abbildung 3.18b bzw. 3.18c gezeigt. Die Klassenmittelungen zeigen, dass die Struktur innerhalb dieser Gruppe von kleineren Komplexen erstaunlich homogen und relativ kompakt ist. Der Durchmesser dieser Strukturen beträgt ungefähr 10 nm. Der Erfahrung nach entspricht das einem Molekulargewicht von 200-400 kDa. Bei einem monomeren Molekulargewicht von MBPYscV_{c326} von 86 kDa würde das bedeuten, dass in dieser Struktur ein Dimer oder Tetramer (344 kDa) stecken kann. Dieser Befund läßt sich gut mit den vorangegangenen Ergebnissen aus der Gelfiltration und den Nativ-PAGE Analysen

²Institut für Elektronenmikroskopie, Fakultät für Chemie, TU München

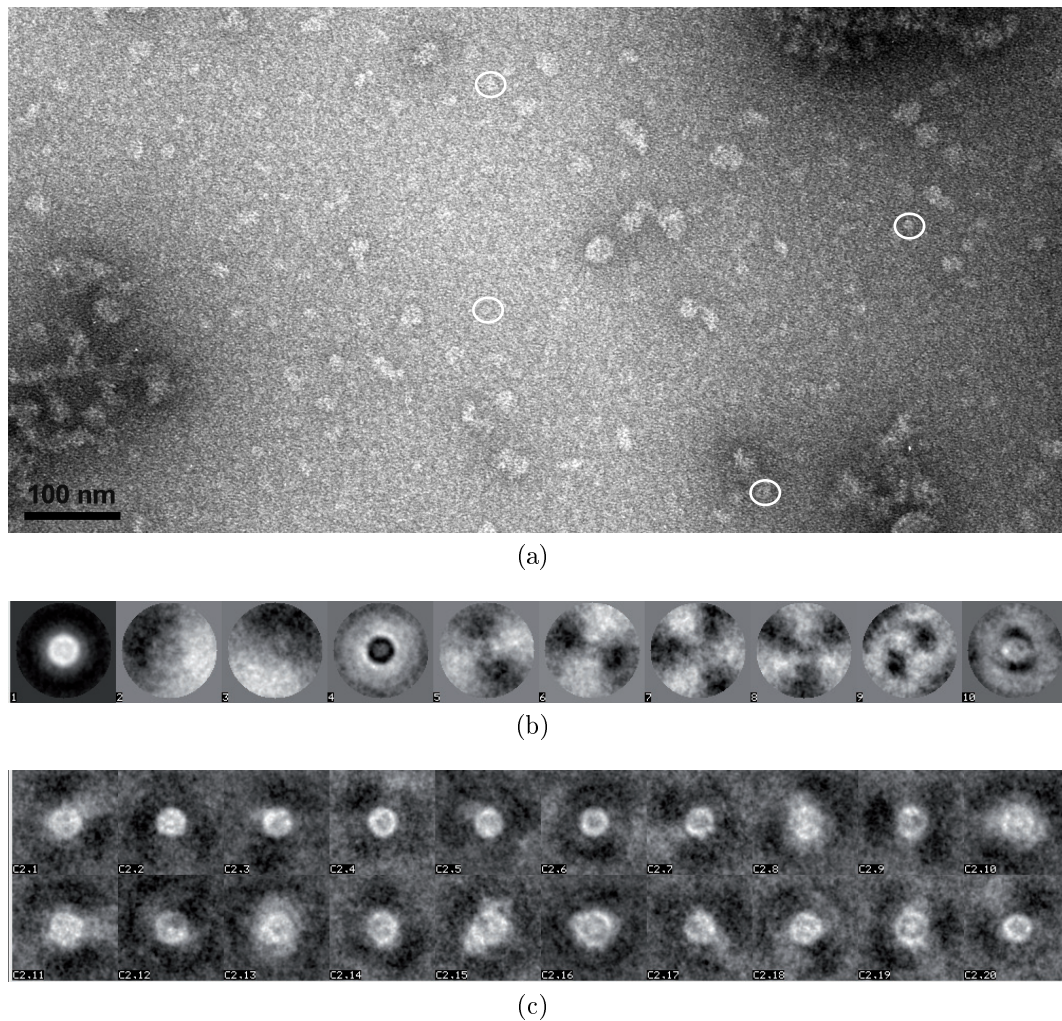
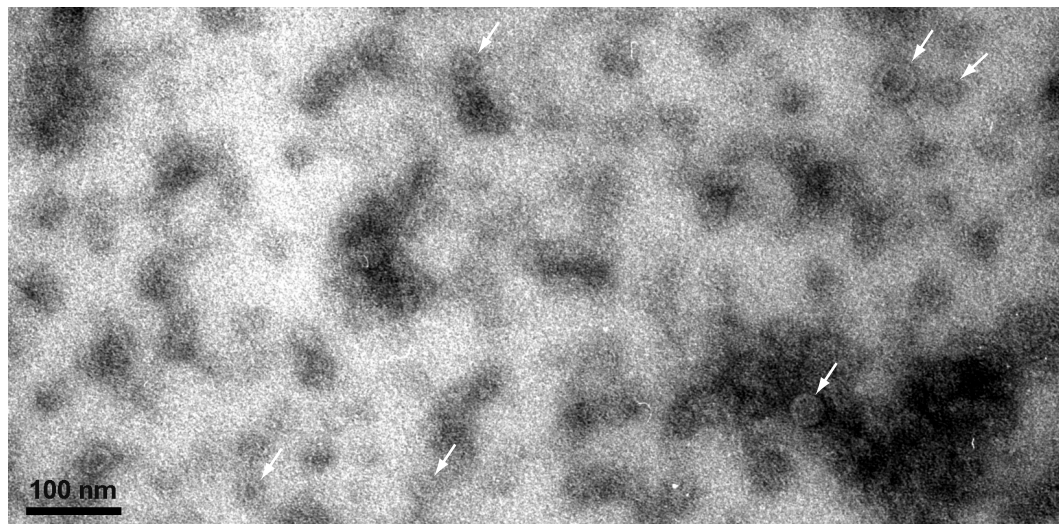


Abbildung 3.18: TEM-Analyse von MBPYscV_{c326} Oligomeren

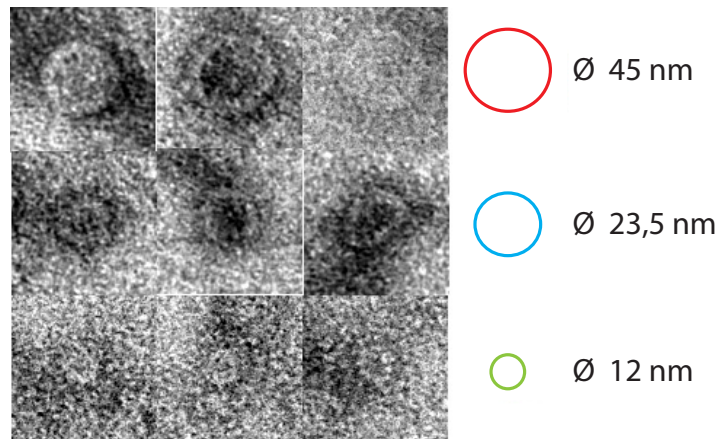
(a) TEM-Aufnahme von negativ-gefärbten MBPYscV_{c326} Oligomeren. Die Proteine wurden mit aqua_{bidest} auf 0.1 mg/ml verdünnt und mit 1.5 % (w/v) Uranylacetat, pH 4.5 gefärbt. Für die anschließende Bildbearbeitung wurden 961 Einzelbilder aus 2 Negativen semi-automatisch ausgewählt. (b) Eigenbilder 1-10 (c) Charakteristische Klassenmittlungen, die nach Translations- und Rotationsalignierung und Multivariater-Statistischer-Analyse (MSA) erhalten worden. Die weißen Kreise markieren die kleineren MBPYscV_{c326} Komplexe, mit denen die Bildauswertung durchgeführt wurde.

vereinbaren, welche ergaben, dass der größte Anteil von MBPYscV_{c326} als Dimer vorliegt.

Abbildung 3.19a zeigt eine TEM-Aufnahme von negativ-gefärbten Oligomeren der verkürzten zytoplasmatischen Domäne MBPYscV_{c378}, welche sich in der Gelfiltration und den Nativ-PAGE Analysen deutlich homogener verhielt. Dieses Bild bestätigt sich auch in den TEM-Aufnahmen, welche Strukturen mit deutlich homogenerer Größe zeigen. Zur besseren Orientierung sind einige dieser Komplexe mit einem weißen Pfeil markiert. Für eine MSA gab es leider nicht genug Partikel, dafür müssen zunächst mehr TEM-Aufnahmen gemacht werden. Die Einzelbilder ergaben aber bereits sehr gute strukturelle Hinweise und wurden einer genaueren manuel-



(a)



(b)

Abbildung 3.19: TEM-Analyse von MBPYscV_{c378} Oligomeren

(a) TEM-Aufnahme von negativ-gefärbten MBPYscV_{c378} Oligomeren. Die Proteine wurden mit aquabidest auf 0.1 mg/ml verdünnt und mit 1.5 % (w/v) Uranylacetat, pH 4.5 gefärbt. (b) Ausgewählte Einzelbilder, welche die drei typischen Oligomergrößen von MBPYscV_{c378} zeigen. Für jede Größe sind jeweils drei repräsentative Einzelbilder dargestellt. Die Größenangaben beziehen sich auf den Durchmesser der ringförmigen Strukturen.

len Analyse unterzogen. Es ergaben sich drei typische Komplexgrößen, welche mit jeweils drei exemplarischen Einzelbildern in Abbildung 3.19b gezeigt werden. Die ungefähren Durchmesser dieser Strukturen betragen 12 nm, 23.5 nm und 45 nm. Die mittlere Komplexgröße, mit einem Durchmesser von ca. 23.5 nm, könnte einen oktameren oder dekameren Komplex von MBPYscV_{c378} repräsentieren und unterstützt damit die Befunde zur Oligomergröße von MBPYscV_{c378}, welche mittels Gelfiltration und nativer Gelelektrophorese erhalten wurden. Erstaunlich sind weiterhin die sehr deutlichen Ring-artigen Strukturen, die besonders gut in den beiden größeren Komplexen zu erkennen sind. Diese Ringstrukturen waren äußerst stabil, da so gut wie keine Verformungen zu identifizieren waren. Daher kann man davon ausgehen,

dass ein Ring die wahrscheinlichste Struktur für die MBPYscV_{c378} Oligomere ist, obgleich man mit diesen Analysen nicht klären kann, welche der beobachteten Ringgrößen *in vivo* im T3SS vorliegt. Für eine detailliertere Analyse von MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} müssen für beide Proteine zunächst mehr Aufnahmen gemacht werden, um eine größere Zahl an Einzelbildern für die MSA zur Verfügung zu haben. Diese Analyse konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht abgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der EM-Aufnahmen zeigen sehr schön, dass es sich bei den großen, oligomeren Komplexen von MBPYscV_c um sehr geordnete Strukturen handelt, welche im Fall von MBPYscV_{c378} stabile Ringstrukturen ausbilden.

3.3.3 Berechnung eines oktameren ringförmigen Modells von MBPYscV_{c378} aus Röntgenkleinwinkelstreudaten

Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) erlaubt die niedrig-auflösende Darstellung der drei-dimensionalen Ausdehnung eines Proteins oder Proteinkomplexes in Lösung unter verschiedensten Pufferbedingungen. Der große Vorteil ist, dass sie den oft limitierenden Schritt der Kristallisierung bei der Strukturaufklärung eines Proteins umgeht. Die SAXS-Messungen sollten die Daten aus den EM-Analysen ergänzen und ein Strukturmodell für die MBPYscV_c Oligomere in Lösung liefern. Die SAXS-Analysen wurden in Kooperation mit dem EMBL, Hamburg am Speicherring DORIS des DESY unter Betreuung von Dr. Manfred Rössle durchgeführt (siehe Abschn. 2.13).

Es wurden beide MBP-Fusionsvarianten von YscV_c vermessen. Die Vermessung der vollständigen zytoplasmatischen Domäne MBPYscV_{c326} bestätigte die extrem große Heterogenität und die Existenz von Oligomeren mit bis zu über 700 kDa Molekulargewicht, was bereits in allen anderen Analysemethoden gezeigt wurde. Für die Berechnung von drei-dimensionalen Modellen aus SAXS Streukurven ist eine Monodispersität (oder zumindest moderate Polydispersität) des Proteins, also eine Lösung mit einheitlich großen Proteinkomplexen, eine essentielle Voraussetzung. Daher konnte aus den Streudaten zu MBPYscV_{c326} keine Modellberechnung vorgenommen werden. Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte sein, dass man die verschiedenen oligomeren Subpopulationen mithilfe der Gelfiltration voneinander trennt und direkt nach der Elution im SAXS vermisst, bevor sich ein Oligomergleichgewicht wieder einstellen kann.

Aus der Vermessung der verkürzten zytoplasmatischen Domäne MBPYscV_{c378} ergab sich, dass sie sich deutlich weniger heterogen verhält als MBPYscV_{c326}, jedoch auch große Oligomere mit einem Molekulargewicht im Bereich von 700 kDa ausbildet. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse der vorhergehenden Analysen mittels Gelfiltration und Nativ-PAGE, welche ebenfalls gezeigt hatten, dass MBPYscV_{c378} relativ homogen vorliegt und Komplexe mit einem ungefähren Molekulargewicht

von 700 kDa ausbildet. Da ein geringer Grad an Polydispersität noch akzeptabel ist, wurde eine Modellberechnung für MBPYscV_{c378} angestrebt, deren Ergebnis in Abbildung 3.20 zu sehen ist. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SAS-

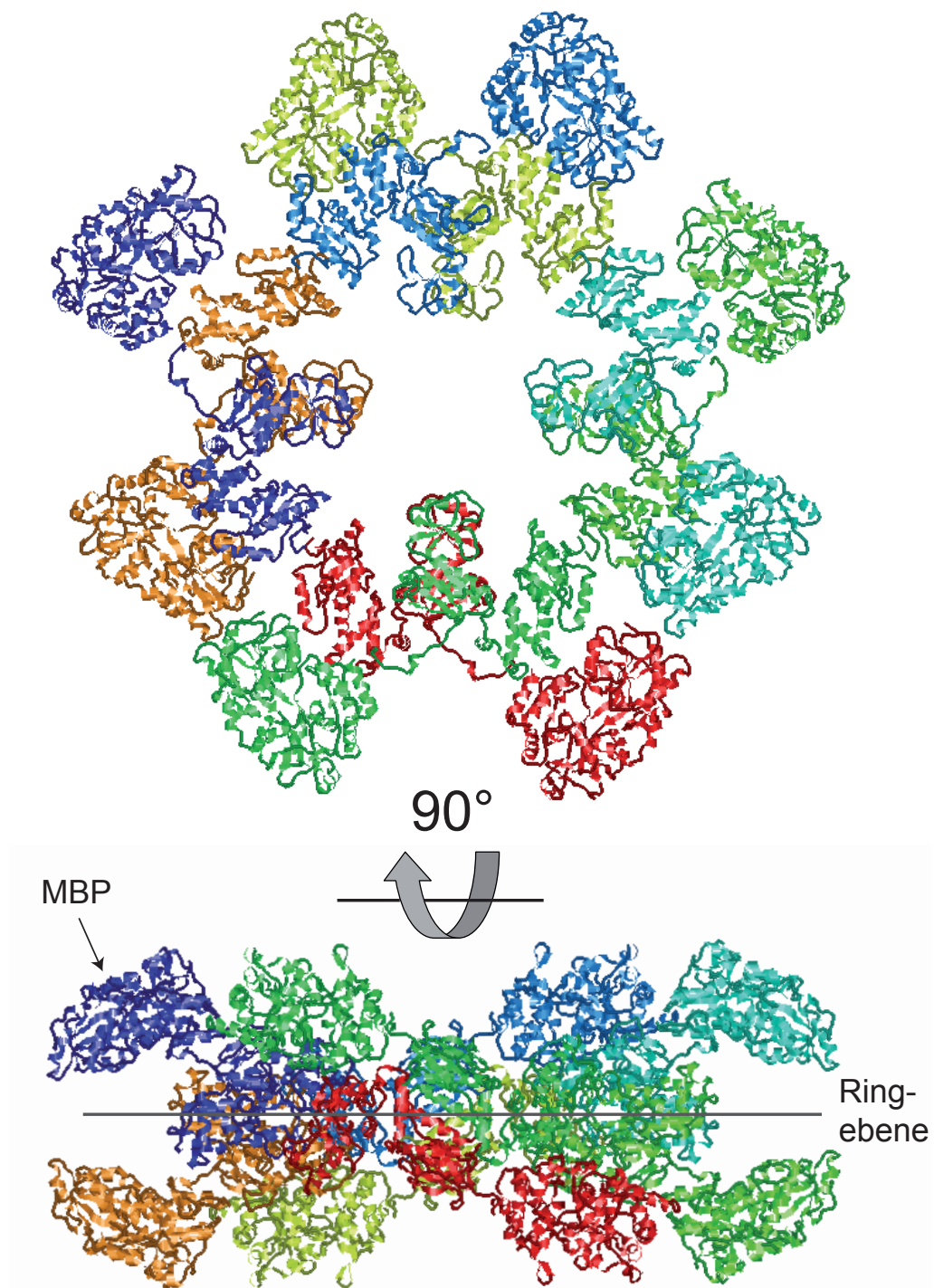


Abbildung 3.20: Modell eines oktameren Ringes von MBPYscV_{c378}

Für die Modellierung des Oktamers in die SAXS Streudaten wurden die Kristallstrukturen von MBP und der zytoplasmatischen Domäne von FlhA (Flagellenhomolog von YscV) verwendet. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SASREF [117] unter Vorgabe einer p42 (8-fach) Symmetrie nach dem Prinzip des *rigid body modelling*. Jedes der acht MBPYscV_{c378} Momomere ist in einer anderen Farbe dargestellt.

REF [117]. Für die Modellierung wurden die Kristallstrukturen von MBP aus *E. coli* (PDB Code: 1ANF) und der zytoplasmatischen Domäne des Flagellenhomologs FlhA aus *S. enterica* (PDB Code: 3A5I) verwendet. Aus den beiden Monomeren wurde zunächst das Fusionsprotein MBPYscV_{c378} mit einer flexiblen Linkerdomäne modelliert. Mit diesem Monomer wurde anschließend durch *rigid body modelling* die Quartärstruktur des MBPYscV_{c378} Oligomers berechnet. Bei diesem Verfahren wird die Quartärstruktur eines multimeren Komplexes aus hochauflösenden Strukturen seiner Untereinheiten modelliert. Dafür wurde eine p24 (8-er) Symmetrie zugrunde gelegt, basierend auf den Ergebnissen der Gelfiltration, *BlueNative*-PAGE und Elektronenmikroskopie, welche ein Oktamer nahelegen. Die Berechnungen ergaben eine Ringstruktur für MBPYscV_{c378}, welche in Abbildung 3.20 in einer Vorder- und Seitenansicht dargestellt ist. Jede der acht Untereinheiten, bestehend aus MBP und YscV_{c378} verbunden durch eine Linker-Domäne, ist in einer anderen Farbe dargestellt. Der innere Ring wird durch die YscV_{c378} Domänen gebildet, welche den Kontakt zwischen den einzelnen Untereinheiten herstellen. In der unteren Seitenansicht des Modells ist die Ringebene markiert, welche durch die YscV_c-Untereinheiten gebildet wird.

Da die Daten für dieses Modell jedoch aus einer heterogenen Probe gewonnen wurden, ist es mit einiger Einschränkung zu behandeln. Sicher kann gesagt werden, dass die SAXS-Daten ein Ring-förmiges Modell unterstützen und dass eine der Subpopulationen einem Oktamer entspricht. Das haben SAXS und Elektronenmikroskopie unabhängig voneinander ergeben.

3.4 Funktionelle Charakterisierung von YscV

3.4.1 Überexpression von YscV reprimiert die Yop-Sekretion in *Y. enterocolitica*

Eine YscV Deletionsmutante besitzt einen pleiotropen Phänotyp. Die typische Wachstumsinhibition, welche in Yersinien bei 37°C und gleichzeitiger Ca²⁺-Depletion eintritt, ist in einer YscV-Mutante aufgehoben. Außerdem ist sowohl die T3-Sekretion von LcrV und der Yops inhibiert als auch die Transkription mehrerer T3SS assoziierter Operone reprimiert [122, 123]. Der Wachstumsphänotyp kann auch durch die Überexpression von YscV erzeugt werden und deutet auf eine regulatorische Funktion von YscV hin. Einen Beweis für eine intensive Wechselwirkung mit anderen Komponenten des T3SS haben auch Arbeiten zur Überexpression von FlhA, dem YscV Homolog aus Flagellen, geliefert. Diese Überexpression in *S. enterica* Wildtypstämmen führt durch die Titration von anderen Komponenten/Substraten zu einer starken Inhibition der Flagellen-abhängigen Motilität der Bakterien [99, 137, 101]. Daher wurde überprüft, ob die Überproduktion von YscV einen Einfluss auf die Se-

ekretion hat. Zu diesem Zweck wurde *Y. enterocolitica* WA-314 mit pYscVHis und pHisYscV_{c378} transformiert, welche Vollängen YscVHis bzw. die verkürzte zytoplasmatische Domäne HisYscV_{c378} exprimieren. Als Kontrolle diente *Y. enterocolitica* WA-314 mit Leervektor pWS. Für die Induktion der Yop-Sekretion wurden die *Yersinia* Kulturen nach dem beschriebenen Protokoll angezogen (Abschn. 2.10). Zeitgleich mit der Yop-Induktion wurden die YscV-Konstrukte bzw. der Leervektor durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden jeweils 2 ml Kultur

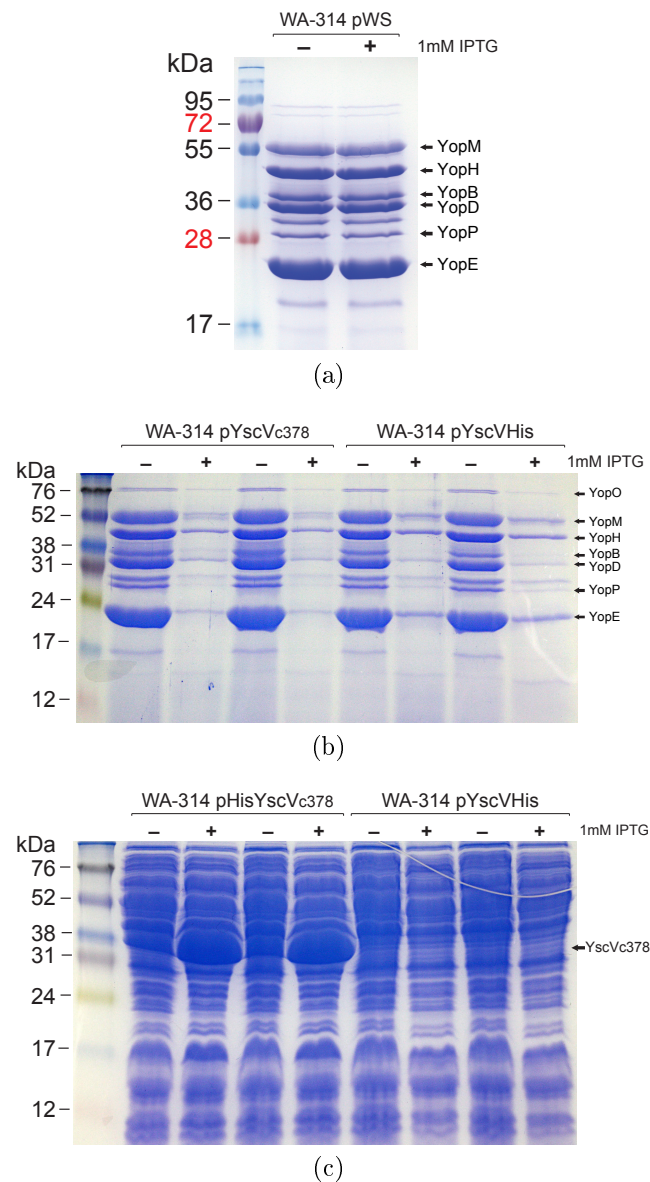


Abbildung 3.21: YscV Überexpression inhibiert die Yop Sekretion

Coomassie-gefärbtes 15 % SDS-Gel. *Y. enterocolitica* WA-314 wurde mit pWS (a) bzw. pHisYscV_{c378} und pYscVHis (b) transformiert und der Einfluß der Überexpression von HisYscV_{c378} und YscVHis auf die Yop Sekretion analysiert. (a) Yop-Kulturüberstände von *Y. enterocolitica* WA-314 pWS ohne und mit 1 mM IPTG Induktion (b) Yop-Kulturüberstände von *Y. enterocolitica* WA-314 pHisYscV_{c378} und pYscVHis ohne und mit IPTG Induktion (c) Zellysate von *Y. enterocolitica* WA-314 mit pHisYscV_{c378} und pYscVHis ohne und mit 1 mM IPTG Induktion

geerntet, die Yops aus den Kulturüberständen präpariert und die Zellysate durch Aufnahme des Zellpellets in Lämmli-Puffer gewonnen. Die Auswertung erfolgte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 3.21).

In der Kontrolle mit leerem pWS Vektor zeigen die Yersinien unabhängig von der IPTG-Induktion ein identisches und vollständiges Yop-Sekretionsmuster, alle Yops sind im Überstand zu finden (Abb. 3.21a). Der Versuch mit HisYscV_{c378} und YscV-His wurde mit jeweils zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Bei beiden Konstrukten führte die YscV Überexpression zur einer nahezu vollständigen Inhibition der Yop-Sekretion (Abb. 3.21b). Das korrespondierende SDS-Gel mit den aufgetragenen Zellysaten zeigt, dass bei HisYscV_{c378} der Einbruch der Yop-Sekretion mit einer starken Expressionsinduktion von HisYscV_{c378} korreliert. Die Expression von YscVHis war dagegen zu schwach, um sie im Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektieren zu können. Die Menge an produziertem YscVHis reichte aber trotzdem aus, um mit der Yop-Sekretion zu interferieren.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass trotz der Aggregation der YscV Konstrukte in *inclusion bodies* eine Interaktion mit anderen T3SS Komponenten bzw. Substraten stattfand.

Um dies zu überprüfen, wurde ein einfacher experimenteller Ansatz gewählt. Aufgereinigte *inclusion bodies*, die HisYscV_{c378} enthielten, wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot auf das Vorhandensein der drei T3SS Substrate YopE, YopH und LcrV analysiert. Als Kontrolle diente YadA, das Membran-ständige *Yersinia* Adhäsın A, welches kein Substrat des T3SS ist oder andere bekannte Wechselwirkungen mit ihm eingeht. Alle drei getesteten Yops konnten in den *inclusion bodies* detektiert werden, YadA jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deuten an, dass YscV trotz seiner Aggregationsneigung spezifisch mit Substraten des T3SS interagiert, wodurch diese nicht mehr der Yop Sekretion zugeführt werden können. Dies führt in der Folge zu dem beobachteten Einbruch der Yop-Sekretion.

3.4.2 YscV interagiert mit Substraten des T3SS

Die ersten Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung von HisYscV_{c378} mit Substraten des T3SS sollte genauer analysiert werden. Es wurden zwei methodische Ansätze gewählt, um die Wechselwirkungen darzustellen: die Nativ-PAGE und die chemische Quervernetzung (Crosslinking). Bei der Nativ-PAGE werden die Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen nur nach ihrem individuellen Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Mit dieser Methode lassen sich Wechselwirkungen gut darstellen, es besteht allerdings die Gefahr, dass instabile bzw. transiente Wechselwirkungszustände unter dem Einfluß des elektrischen Feldes wieder aufgelöst werden. Daher wurde das Crosslinking als zweite Methode gewählt, weil dabei durch kovalente Verknüpfungen stabile Komplexe erzeugt werden, welche anschlie-

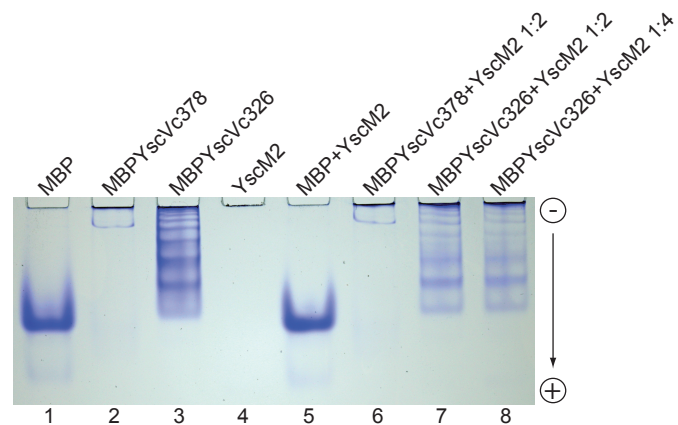
ßend unter denaturierenden Bedingungen analysiert werden können.

Die Analysen wurden mit den MBP-Fusionsvarianten von YscV_c durchgeführt. Als Kontrolle für die Spezifität der Wechselwirkungen wurde reines Maltose-Bindeprotein eingesetzt. Als Interaktionspartner wurden Proteine verschiedener Substratklassen und ein Chaperon des T3SS ausgewählt. Es wurden YscF (Nadelprotein, frühes Substrat), LcrV (Nadelspitzenprotein, bildet eigene Substratklasse mit den Translokatoren), YscM1 und YscM2 (sekretierte Regulatoren des T3SS), YopH (Effektorprotein) und SycH (Chaperon von YopH) verwendet. Sie repräsentieren verschiedene Stadien im Assemblierungs - und Sekretionsprozess des T3SS.

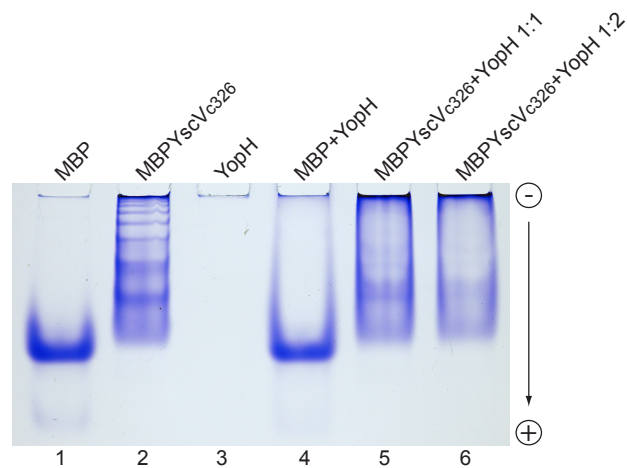
3.4.2.1 Identifizierung von Interaktionspartnern in der Nativ-PAGE

Für die Analyse in der Nativ-PAGE wurden die Proteine einzeln bzw. gemeinsam mit den entsprechenden Interaktionspartnern in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1, 1:2 oder 1:4 (YscV_c : Interaktionspartner) gemischt und bei RT für 10 min. inkubiert. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte wie in Abschnitt 2.8.2.2 beschrieben.

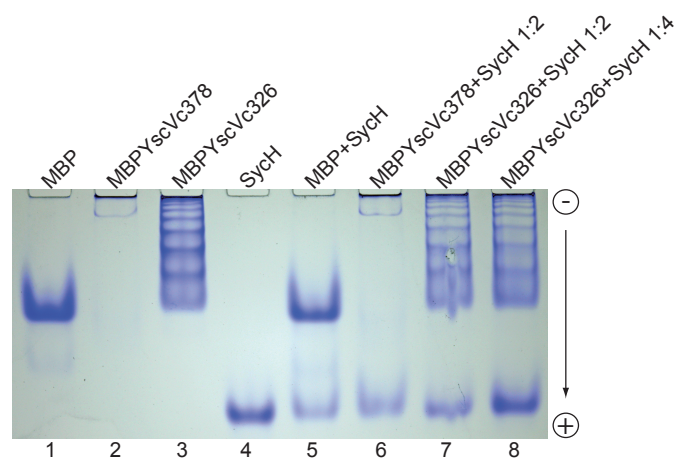
Das Ergebnis der Analyse mit YscM2 ist in Abbildung 3.22a zu sehen. MBP migriert als einzelne Bande, die vermutlich dem Monomer entspricht, wie in der *BlueNative*-PAGE gezeigt wurde (Abschn. 3.3.1). YscM2 besitzt einen hohen Isoelektrischen Punkt von 9.79. Durch den neutralen pH des Nativ-PAGE Puffersystems und der angelegten Polung des elektrischen Feldes (siehe Abb. 3.22) wandert es daher nicht ins Gel ein. MBPYscV_{c326} zeigt ein Leiter-artiges Bandenmuster, welches die verschiedenen Oligomeresisierungszustände widerspiegelt. Die verkürzte zytoplasmatische Domäne YscV_{c378} verhält sich dagegen eher homogen, ebenfalls wie in der *BlueNative*-PAGE beobachtet. Der Komplex scheint jedoch so hochmolekular zu sein, dass er gar nicht richtig ins Gel einwandert. Entsprechend ist im Ansatz mit YscV_{c378} und YscM2 auch keine Wechselwirkung zu beobachten. In dem Ansatz mit YscV_{c326} und YscM2 gibt es jedoch eine Intensitätsabnahme im YscV_{c326} Bandenmuster gegenüber dem Ansatz mit YscV_{c326} alleine (Abb. 3.22a, vergl. Spur 3 mit Spuren 7+8). Dieser Effekt war reproduzierbar, er ist aber sehr schwer zu interpretieren. Eine Wechselwirkung zwischen YscM2 und MBPYscV_{c326} würde sich auch in einem veränderten Migrationsverhalten von YscM2 zeigen. Daher wurde die native Gelelektrophorese mit gegensätzlicher Polung des elektrischen Feldes wiederholt, bei der aufgrund seines hohen Isoelektrischen Punktes nur YscM2 ins Gel einwandern kann. Es konnte jedoch kein verändertes Migrationsverhalten von YscM2 gegenüber dem gemischten Ansatz mit YscM2 und MBPYscV_{c326} festgestellt werden. Auch eine Überprüfung im Western Blot konnte die vermutete Wechselwirkung nicht bestätigen, das heißt es konnte kein YscM2 Signal mit MBPYscV_{c326} Proteinbanden kolokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Da native Komplexe jedoch unter dem Einfluss des elektrischen Feldes in der Nativ-PAGE jederzeit wieder dissoziieren kön-



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.22: Analyse der Wechselwirkung von YscV_{c326} mit YscM2, YopH und SycH in der Nativ-PAGE

Coomassie-gefärbte 6 % HEPES Nativ-Gele, pH 7.4. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 90 min. auf Eis. Die angelegte Polung des elektrischen Feldes ist eingezeichnet. Es wurden jeweils 10 µg MBP, YscV_{c378} und YscV_{c326} eingesetzt. YscM2, YopH und SycH wurden im angegebenen stöchiometrischen Verhältnis eingesetzt. (a) Wechselwirkung zwischen YscV_c und YscM2 (b) Wechselwirkung zwischen YscV_c und YopH (c) Wechselwirkung zwischen YscV_c und SycH.

nen, konnte eine Wechselwirkung beider Proteine noch nicht ausgeschlossen werden. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, musste die mögliche Wechselwirkung daher mittels Crosslinking überprüft werden (siehe unten).

Das Ergebnis der Analyse mit YopH ist in Abb. 3.22b zu sehen. Durch seinen hohen Isoelektrischen Punkt von 8.92 wandert YopH ebenfalls nicht ins Gel ein. Für die Interaktionsanalyse mit YopH wurde nur YscV_{c326} verwendet. Die gemeinsame Inkubation von YscV_{c326} und YopH führte dazu, dass sich das typische Bandenmuster von YscV_{c326} veränderte bzw. auflöste (Spuren 5+6). Außerdem schien sich dieser Effekt bei einem höheren stöchiometrischen Verhältnis von YopH:YscV_{c326} zu verstärken. Der gleiche Effekt trat auf wenn YscV_{c326} mit einem prä-assemblierten Komplex aus YopH/SycH inkubiert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Überprüfung im Western Blot konnte die vermutete Wechselwirkung jedoch nicht bestätigen, dass heißt es konnte kein YopH Signal mit dem veränderten Bandenmuster von MBPYscV_{c326} kolokalisiert werden.

Eine Inkubation von YscV_{c326} mit SycH alleine hatte dagegen keinen Effekt auf das Bandenmuster bzw. Laufverhalten von YscV_{c326} (Abb. 3.22c). Für die Proteine LcrV und YscM1 konnten ebenfalls keine Wechselwirkungen in der Nativ-PAGE identifiziert werden (YscF wurde in der Nativ-PAGE nicht analysiert). Die Tatsache, dass nicht alle untersuchten T3SS Substrate einen Effekt auf das Laufverhalten von MBPYscV_c hatten, ist zumindest ein Hinweis darauf, dass die beobachteten Veränderungen spezifischer Natur zu sein scheinen.

3.4.2.2 Identifizierung von Interaktionspartnern mittels chemischer Quervernetzung (Crosslinking)

Die Ergebnisse aus der Nativ-PAGE Analyse sollten mittels Crosslinking konsolidiert werden. Dafür wurden zunächst die Crosslinking Agenzien DSP, EGS und Sulfo-EGS in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um die optimalen Bedingungen herauszufinden. Sulfo-EGS lieferte die besten Ergebnisse und wurde daher für alle weiteren Analysen mit einer Endkonzentration von 2 mM im Reaktionsansatz verwendet. Es wurden die oben erwähnten Proteine YscF, LcrV, YscM1, YscM2, YopH und SycH auf ihre Wechselwirkung mit YscV_{c326} getestet. Durch das Crosslinking wurden die großen Oligomere mit einem Molekulargewicht von über 250 kDa erfasst, so dass die Elektrophorese in einem 6 %-igen SDS-Gel durchgeführt werden musste.

Die Proteine LcrV, YscF, YscM1 und SycH zeigten im Crosslinking, ebenso wie in der Nativ-PAGE, keine Wechselwirkung mit YscV_{c326}. Auch für YopH konnte keine Wechselwirkung mit MBPYscV_{c326} gezeigt werden, obwohl die Analyse in der Nativ-PAGE auf eine Interaktion hingedeutet hatte.

Das Crosslinking mit YscM2 konnte jedoch die bereits vermutete Wechselwirkung mit YscV_{c326} bestätigen. Abbildung 3.23 zeigt die Auswertung der Crosslinking An-

sätze im SDS-Gel und die Identifizierung der spezifischen Interaktionen im Western Blot. Das Coomassie-gefärbte denaturierende SDS-Gel (Abb. 3.23a) zeigt, dass MBP sowohl ohne als auch mit S-EGS als Monomer bei ca. 40 kDa läuft (Spuren 1+2). MBPYscV_{c326} hat ein Molekulargewicht von ca. 86 kDa und migriert im Ansatz ohne S-EGS als Monomer (Spur 3). In der Spur mit S-EGS kann man aber mehrere höher molekulare Banden identifizieren, welche bei ca. 200 kDa bzw. über 250 kDa migrieren (Spur 4). Sie repräsentieren vermutlich das Dimer (ca. 170 kDa) und die nächstgrößeren Zustände, Tetramer (ca. 340 kDa) etc. YscM2 ist im Gel nicht zu sehen, da es mit einem Molekulargewicht von 13 kDa aus dem Gel herausgelaufen ist (Spuren 5+6).

Alle Ansätze wurden nochmals nach dem gleichen Schema in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anti-MBP Antikörpern und anti-YscM2 Serum inkubiert (Abb. 3.23b und c), um spezifische Komplexe aus MBPYscV_{c326} und YscM2 zu identifizieren. Die Detektion von YscM2 im Western Blot (Abb. 3.23c) zeigte, dass YscM2 alleine und im Ansatz mit MBP sowohl ohne als auch mit S-EGS deutlich schneller als die 55 kDa Markerbande migriert (Spuren 5-8). Dies schließt eine Interaktion mit MBP aus, da selbst der kleinste mögliche Komplex aus einem MBP und YscM2 Monomer ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa besitzen würde. Nach der Inkubation von YscM2 mit YscV_{c326} und S-EGS wird jedoch ein YscM2 Schmiersignal detektiert, welches sich von ca. 100 kDa bis an die obere Trenngelgrenze durchzieht (Spur 10) und im Ansatz ohne den Crosslinker S-EGS (Spur 9) nicht detektiert wird. Dieses YscM2-Signal kolokalisiert mit einem Signal im anti-MBP Western Blot (Abb. 3.23b, Spur 10). Dies bestätigt die vermutete Wechselwirkung zwischen YscM2 und YscV_{c326} und zeigt, dass YscM2 vermutlich mit verschiedenen oligomeren Zuständen von YscV_{c326} interagieren kann.

Die Interaktionsstudien mit MBPYscV_c erbrachten, dass YscV_c als Fusion mit MBP nicht nur strukturell, sondern auch funktionell intakt ist und somit die hier gezeigten Wechselwirkungen eingehen kann. Es konnten Wechselwirkungen mit dem sekretierten T3SS Regulatorprotein YscM2 und möglicherweise auch mit dem T3SS Effektorprotein YopH nachgewiesen werden und somit erstmals Substrate des T3SS als Interaktionspartner von YscV identifiziert werden.

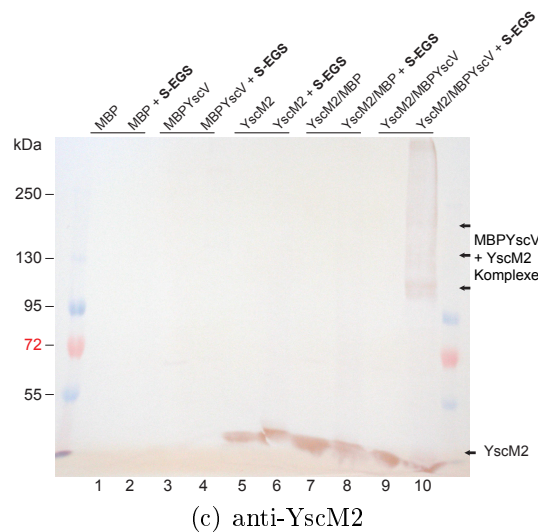
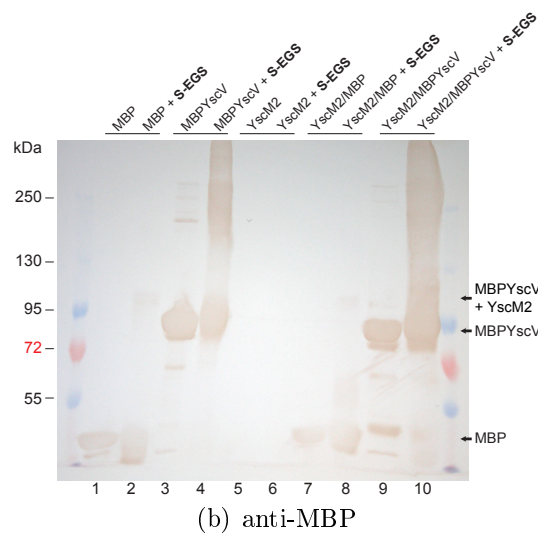
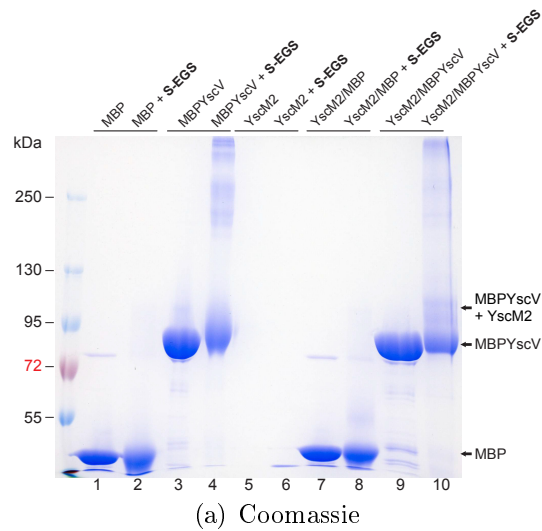


Abbildung 3.23: Analyse der Wechselwirkung zwischen YscV_{c326} und YscM2 mittels chemischer Quervernetzung

Auftrennung der Proteine erfolgte in einer 6 %-igen SDS-PAGE. Anschließend erfolgte (a) Färbung mit Coomassie (b) Western Blot und Detektion mit anti-MBP Antikörper (c) Western Blot und Detektion mit anti-YscM2 Serum. Das Crosslinking erfolgte in HEPES-Puffer pH 7.5 mit 2 mM Sulfo-EGS für 30 min. bei RT. YscV_{c326} und YscM2 wurden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 eingesetzt.

4. Diskussion

4.1 Das Typ-III-Sekretionssystem und seine essentielle Komponente YscV

Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ist ein hochkomplexer, multimerer Proteinapparat, bestehend aus ungefähr 25 membranständigen und zytosolischen Einzelkomponenten, welcher sich über einen mehrstufigen Prozess in eine geordnete Struktur assemblieren muss [34, 37]. Diese geordnete Struktur ist wiederum eine essentielle Grundlage für die Funktion des T3SS, nämlich die Translokation von Effektorproteinen über beide bakterielle Membranen in die eukaryotischen Wirtszellen. Dass die Translokation möglicherweise nicht in einem einzigen Schritt geschieht wie bisher angenommen, haben neueste Studien von Akopyan *et al.* gezeigt [4]. Nach diesen neuen Befunden kann die T3SS-abhängige Translokation in die Wirtszellen auch nach einer extrazellulären Lokalisierung der Yops auf der Bakterienoberfläche erfolgen.

Die Assemblierung des T3SS und die anschließende Translokation der Effektoren benötigen eine präzise Regulation. Der Exportapparat ist dabei ein zentraler Bestandteil, weil er die eigentliche Sekretionsmaschine des T3SS darstellt. Er sekretiert nicht nur die Effektorproteine sondern in der Phase der Assemblierung auch die Komponenten des T3SS selbst.

Da das T3SS ein essentieller Virulenzfaktor in vielen gram-negativen Tier- und Pflanzenpathogenen ist, muss dieser Prozess in seinen Details verstanden werden [55]. Dafür müssen jedoch drei grundlegende Fragen beantwortet werden. Wie sehen die Strukturen der T3SS-Komponenten aus und in welcher Stöchiometrie liegen sie im vollständig assemblierten T3S-Apparat vor? Welche Wechselwirkungen gehen diese Komponenten mit sich selbst, untereinander und mit den Substraten des T3SS ein? Und drittens, welche Mechanismen liegen diesen Wechselwirkungen und der Substraterkennung zugrunde?

Die Visualisierung des T3S-Apparates in seiner Gesamtheit durch die Elektronenmikroskopie hat einen sehr beeindruckenden Einblick in die Morphologie dieses komplexen Systems gebracht [95, 58]. Außerdem existieren mittlerweile Kristallstrukturen für einige zytosolische Komponenten bzw. periplasmatische Domänen von Transmembrankomponenten. Deren Modellierung in TEM-Aufnahmen von T3S-Apparaten liefern jetzt erste Vorstellungen darüber, wie die Interaktion der Kom-

ponenten zum Aufbau des Membran-übergreifenden Proteinkanals beiträgt [151]. In Abbildung 4.1 ist solch eine Modellierung für die kristallisierten periplasmatischen Domänen der Membranproteine EscC und EscJ aus *Escherichia coli* (*E. coli*) und PrgH aus *Salmonella enterica* (*S. enterica*) dargestellt. In Klammern dahinter sind die entsprechenden Homologen aus *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) erwähnt.

Dieses neu gewonnene Wissen beschränkt sich jedoch auf einige wenige Kompo-

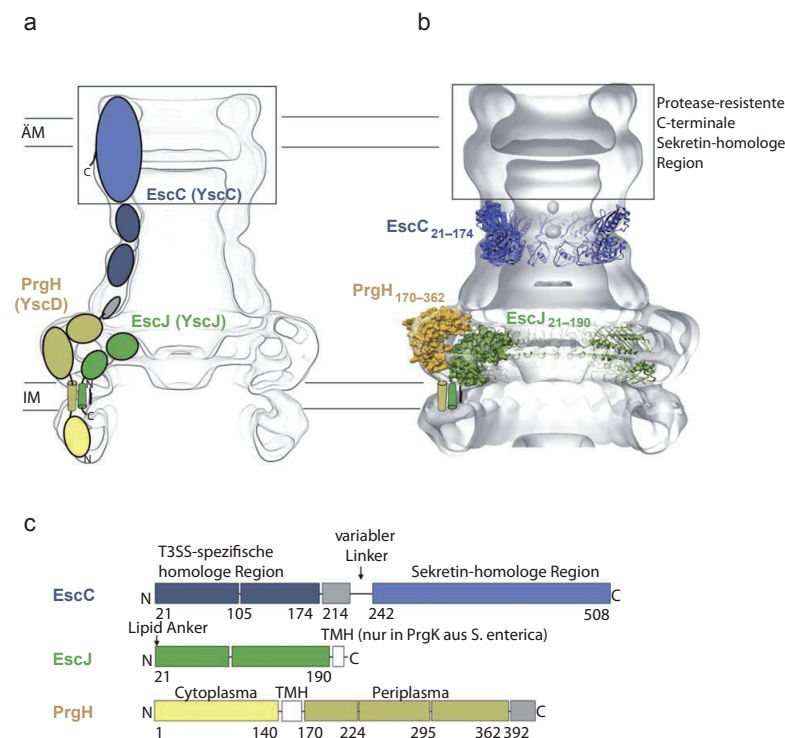


Abbildung 4.1: Rekonstruktion des Basalkörpers des T3SS

(a) Schematische Darstellung des Basalkörpers und der Komponenten, welche die drei Membranringe aufbauen. Gezeigt sind EscC (*E. coli*), EscJ (*E. coli*) und PrgH (*S. enterica*), für deren periplasmatische Domänen eine Kristallstruktur bestimmt werden konnte. In Klammern stehen die entsprechenden Homologen aus *Y. enterocolitica*. (b) Modellierung der Kristallstrukturen von EscC₂₁₋₁₇₄, EscJ₂₁₋₁₉₀ und PrgH₁₇₀₋₃₆₂ in die EM-Karte des T3SS Basalkörpers aus *S. enterica* Thyphimurium. (c) Schematische Übersicht über die verschiedenen strukturellen Domänen von EscC, EscJ und PrgH. Die Abbildung wurde aus Spreter *et al.* [151] entnommen und modifiziert.

ÄM äußere Membran, IM innere Membran, TMH Transmembranhelix

nenten. Für viele, und dazu zählen auch die Komponenten des Exportapparates, ist noch nicht einmal geklärt, wo sie innerhalb des Apparates lokalisiert sind und in welcher Stöchiometrie sie vorliegen.

YscV - eine essentielle Komponente des T3SS

YscV wurde eigentlich schon sehr früh durch Plano *et al.* als Regulator des Lcr (*low-calcium-response*) -Regulons identifiziert [122]. Das Lcr-Regulon umfasst mehrere Gene, welche sowohl das bakterielle Wachstum als auch die Expression der pYV-Plasmid lokalisierten Gene in Abhängigkeit von Temperatur und der Anwesenheit

von Ca^{2+} regulieren [50, 132, 131]. Im Detail bedeutet dies, dass bei 37°C und Ca^{2+} -Mangel das Wachstum der Yersinien innerhalb weniger Generationen eingestellt wird und die Sekretion von T3SS Effektoren aktiviert wird. Man stellt sich vor, dass diese Bedingungen die Situation im Zielwirt widerspiegeln und den Yersinien signalisieren, dass sie am Ort der Infektion angekommen sind.

Deletionen in YscV führen zu einem multiplen Phänotyp. Dazu gehört, dass die Yersinien auch ohne Ca^{2+} bei 37°C wachsen können, dass die Expression der Effektoren vermindert ist und dass es zu einem dramatischen Einbruch der LcrV- und Yop-Sekretion kommt [123]. Dieser Phänotyp deutet bereits an, dass YscV sowohl eine regulatorische Funktion ausübt als auch aktiv an der Sekretion der T3SS-Substrate beteiligt ist. YscV ist mit seinem N-Terminus über 8 Transmembranhelices in der inneren Bakterienmembran verankert und besitzt eine große C-terminale zytoplasmatische Domäne. Es ist die größte Komponente des Exportapparates, dessen Bestandteile alle in der inneren Membran lokalisiert sind. Es gibt jedoch bisher keine Daten zur Struktur von YscV. Erste Ergebnisse, die auf einem Peptid-Epitop Assay beruhen, deuten eine Interaktion zwischen YscV und YscU an, welches ebenfalls eine Komponente des Exportapparates ist [172]. Dieses Ergebnis muss jedoch zunächst noch mit anderen Methoden validiert werden.

Bisher gibt es also keine substantiellen Erkenntnisse über die Struktur oder Funktion von YscV. Daher sollten in dieser Arbeit die zytoplasmatische Domäne von YscV strukturell charakterisiert werden und, durch die Identifizierung von Interaktionspartnern, die Funktion von YscV im T3S-Prozess genauer beschrieben werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst zwei N-terminal trunkierte Varianten der zytoplasmatischen Domäne YscV_c mit einem Histidin-Tag hergestellt und exprimiert. Aufgrund einer unerwartet niedrigen Löslichkeit dieser zytoplasmatischen Domäne, mussten die YscV_c-Varianten als Fusion mit einem Löslichkeit-vermittelnden MBP-Tag produziert werden. Mit diesen Konstrukten wurden anschließend der Oligomersisierungszustand und die strukturellen Eigenschaften der zytoplasmatischen Domäne mithilfe von Gelfiltrations-, Nativ PAGE-, SAXS- und EM-Analysen charakterisiert. Weiterhin wurden die Methoden der Nativ-PAGE und des chemischen Crosslinkings von Proteinen eingesetzt, um lösliche Komponenten bzw. Substrate des T3SS als Wechselwirkungspartner von YscV zu identifizieren.

4.2 Die zytoplasmatische Domäne von YscV verhält sich unerwartet instabil

Für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von YscV wurde die C-terminale, zytoplasmatische Domäne von YscV kloniert. Die Strategie dafür orientierte sich an dem Klonierungs- und Aufreinigungsschema für zwei homologe Proteine von YscV, FlhA und InvA aus *S. enterica*, welche zum Zweck der anschließen-

den Kristallisierung bereits erfolgreich aufgereinigt worden waren [136, 88]. Beide Homologe verhielten sich vollständig löslich und konnten mit einem einfachen Aufreinigungsprotokoll in ausreichender Menge präpariert werden.

Im N-Terminus der zytoplasmatischen Domäne von FlhA wurde durch limierte Proteolyse eine relativ unstrukturierte Linker-Domäne identifiziert, welche die membranständige und die zytoplasmatische Domäne flexibel miteinander verbindet [137, 9]. Dieser Befund wurde bei der Klonierung von YscV_c dahingehend berücksichtigt, dass neben der vollständigen zytoplasmatischen Domäne HisYscV_{c326} auch die N-terminal trunkierte Variante HisYscV_{c378} kloniert wurde. Die Auswahl der Trunkierungsposition erfolgte anhand von Sekundärstrukturvorhersagen, welche für den N-terminalen Bereich (ungefähr AS 322-370) der zytoplasmatischen Domäne von YscV ebenfalls einen niedrigen Sekundärstrukturanteil vorhersagten (siehe Abschn. 3.1) und damit das Vorhandensein einer Linker-Domäne vermuten ließen.

Obwohl die Vorarbeiten an den hoch-konservierten Homologen FlhA und InvA also keine Schwierigkeiten bei der Expression von YscV_c erwarten ließen, aggregierten beide Expressionskonstrukte in *inclusion bodies* nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS unter verschiedenen Kultivierungs- und Induktionsbedingungen.

Daraufhin wurde HisYscV_{c378} mit Chaperonen der Hsp60- und Hsp70-Familie in *E. coli* BL21 (DE3) koexprimiert, um die posttranslationalen Faltungsbedingungen zu verbessern und damit die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Doch dieser Expressionsansatz erbrachte nur eine minimale Erhöhung der Löslichkeit. Außerdem eluierte dieser lösliche Anteil von HisYscV_{c378} in der Aufreinigung mittels IMAC über einen sehr breiten Imidazolgradienten. Dies deutete darauf hin, dass lösliches HisYscV_{c378} nicht korrekt gefaltet war und daher vermutlich noch mit Chaperonen assoziiert vorlag.

Warum sich YscV_c so anders verhält als seine Homologen, läßt sich nicht einfach beantworten. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt einen sehr hohen Konservierungsgrad (Abb. 3.2). Auch ein funktioneller Vergleich der Aminosäuresequenzen bezüglich dem Vorkommen und der Verteilung hydrophober Aminosäuren (Abb. 4.2) zeigt keine Unterschiede, welche die deutlich unterschiedliche Löslichkeit erklären könnten.

Der Unterschied liegt daher vermutlich darin, dass sich die verschiedenen Homologen *in vivo* in einer unterschiedlichen physiko-chemischen Umgebung im T3SS befinden und möglicherweise auch anders strukturierte Wechselwirkungen mit ihren Interaktionspartnern eingehen. Der Unterschied zwischen den offensichtlich sehr konservierten Proteinen der FlhA/YscV/InvA-Familie ist also eher in ihrer natürlichen physiologischen Umgebung im T3SS als in ihrer Aminosäuresequenz zu finden.

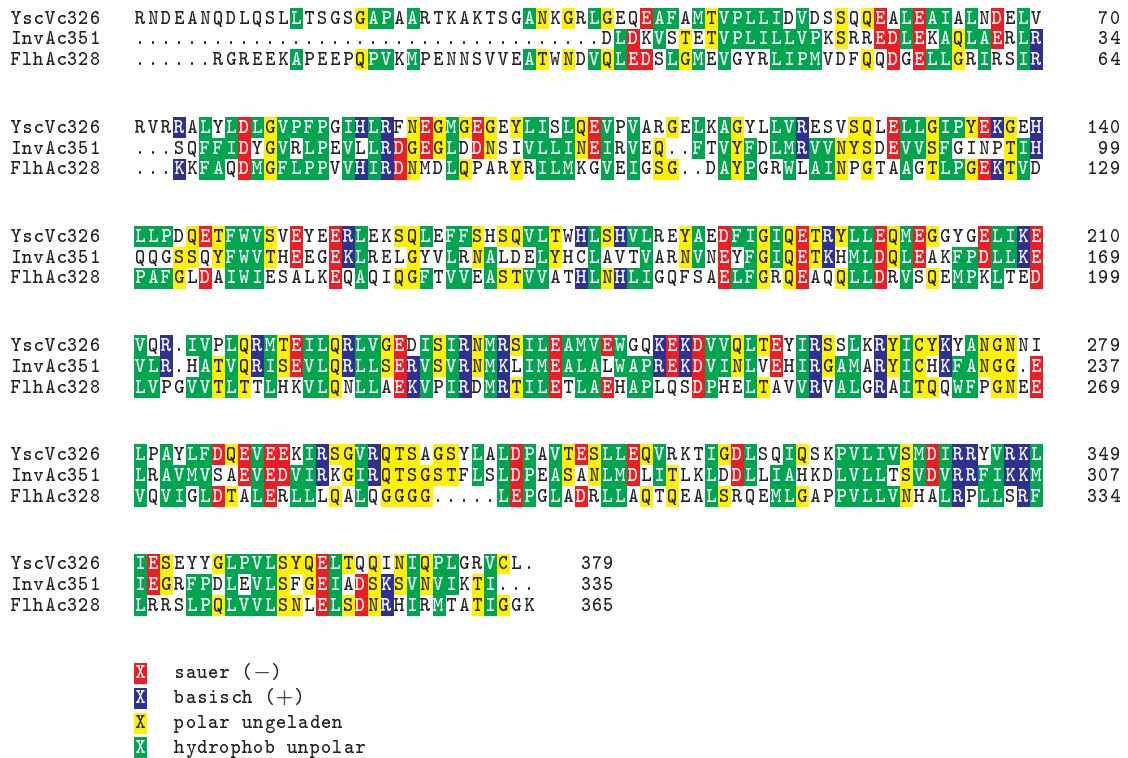


Abbildung 4.2: Verteilung hydrophober Aminosäuren in den zytoplasmatischen Domänen von YscV, InvA und FlhA

Die Proteinsequenzen der zytoplasmatischen Domänen von YscV (AS 326-704), InvA (AS 351-685) aus *S. enterica* und FlhA (AS 328-692) aus *S. enterica* wurden mit ClustalW aligniert und die einzelnen Aminosäuren bezüglich ihrer Hydrophobizität farb-codiert (siehe Legende).

4.3 YscVc assembliert zu hocholigomeren Komplexen

Bisher gibt es keine Daten zur Stöchiometrie der Komponenten des Exportapparates. Man geht jedoch generell davon aus, dass nur wenige Kopien der einzelnen Komponenten im vollständig assemblierten T3SS vorliegen [94, 34]. Diese Annahme begründet sich auf der Hypothese, dass die Komponenten des Exportapparates innerhalb des inneren Membranringes (IM-Ring) lokalisiert sind [94, 95]. Dieser IM-Ring besitzt einen Durchmesser von ungefähr 25 nm in F-T3SS und 20 nm in NF-T3SS [94, 95]. Für das Flagellum wurde berechnet, dass in einem Ring mit diesem Durchmesser ungefähr 70 Transmembranhelices Platz finden. Das würde für die beiden größten Komponenten des Exportapparates FlhA (YscV Homolog) und FlhB (YscU Homolog) keine größeren Oligomere erlauben, da sie allein bereits jeweils 8 bzw. 4 TMH's besitzen [94]. Tatsächlich konnten mittels analytischer Gelfiltration und Sedimentationsgleichgewichts-Ultrazentrifugation der zytoplasmatischen Domänen von FlhA und InvA ausschließlich monomere Spezies nachgewiesen werden [137, 88]. Der Oligomerisierungsgrad dieser Homologen könnte sich aber zwischen den verschied-

denen Spezies bzw. zwischen Flagellum und NF-T3SS unterscheiden oder unter den analysierten Bedingungen artifiziell beeinflusst gewesen sein.

Daher wurde die zytoplasmatische Domäne von YscV bezüglich der Fähigkeit zur Oligomerisierung analysiert. Hierfür wurden die löslichen Konstrukte MBPYscV_{c326} und MBPYscV_{c378} verwendet. Die Analyse erfolgte primär mittels verschiedener Nativ-PAGE Systeme und analytischer Gelfiltration. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den ebenfalls durchgeführten EM-Aufnahmen und SAXS Messungen bestätigt.

Die Analysen zeigten, dass beide Varianten große Oligomere ausbilden. Die vollständige zytoplasmatische Domäne MBPYscV_{c326} verhält sich sehr heterogen und liegt in einem Gemisch aus vermutlich Dimeren, Tetrameren, Hexameren, Oktameren, Dekameren usw. vor, wobei der größte Anteil des Proteins als Dimer existiert. Weiterhin läßt sich nach oben kein klares Ende der Oligomerisierung definieren. Die verkürzte zytoplasmatische Domäne MBPYscV_{c378} verhält sich im Vergleich dazu relativ homogen und bildet ausschließlich hocholigomere Komplexe, welche vermutlich ein Gleichgewicht aus Oktameren und Dekameren repräsentieren. Die Oligomerisierung beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen den YscV-Untereinheiten, da das Fusionsprotein MBP alleine keine Oligomere bildet. Außerdem wurde in ersten Untersuchungen einer Tag-freien Variante von YscV_c ebenfalls beobachtet, dass YscV_c in einem Gleichgewicht aus verschiedenen Oligomeren vorliegt [172]. Weiterhin werden die Ergebnisse durch neueste Daten aus der Fluoreszenzmikroskopie des Flagellen T3SS aus *S. enterica* bestätigt [87]. Sie basieren auf der relativen Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten von FlhA-YFP Fusionsproteinen und postulieren eine mögliche Stöchiometrie für FlhA von ungefähr 20 Untereinheiten im Flagellenapparat. Somit wurde erstmals und mit verschiedenen Methoden gezeigt, dass eine Komponente des Exportapparates als oligomere Spezies vorliegt. Einige Aspekte müssen jedoch diskutiert werden.

(1) Woraus ergibt sich die große Dynamik des Oligomerisierungsgleichgewichtes und warum unterscheiden sich beide Trunkierungsvarianten im Oligomerisierungsgrad? Der Unterschied zwischen den beiden Varianten läßt sich möglicherweise mit der Trunkierung des putativen N-terminalen Linkers erklären. Er stellt einen relativ unstrukturierten Bereich der zytoplasmatischen Domäne dar und kann den oligomeren Zustand des Proteins sterisch erleichtern oder auch behindern. Dieser Linker fehlt in der trunkierten Variante MBPYscV_{c378}, welche relativ stabile Oligomere ausbildet. Im Gegensatz dazu liegt MBPYscV_{c326} in einem dynamischen Gleichgewicht verschiedener Oligomere vor, was normalerweise auf eine schwach transiente Bindung zwischen den Monomeren hinweisen würde. Der Grund ist aber möglicherweise die hohe Flexibilität des Linkers, wodurch die Oligomere schneller wieder zerfallen. Dazu kommt noch die fehlende N-terminale Membrandomäne, welche das Protein normalerweise fest in der Zytoplasmamembran verankert, und die fehlende natürliche Umgebung des T3SS, welches *in vivo* viele Wechselwirkungen mit ande-

ren Komponenten bereitstellt. Diese Faktoren führen *in vivo* vermutlich zu einer ganz natürlichen Begrenzung des Oligomerisierungszustandes von YscV.

(2) Angesichts möglicher großer Oligomere von YscV stellt sich die weitere Frage, wie all diese Untereinheiten ihren Platz innerhalb des T3S Apparates finden. Hierfür haben Li und Sourjik [87] basierend auf den Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen des F-T3SS von *S. enterica* ein Modell für FlhA aufgestellt, dass in Abbildung 4.3 gezeigt ist. In diesem Modell ist die N-terminale Transmembrandomäne

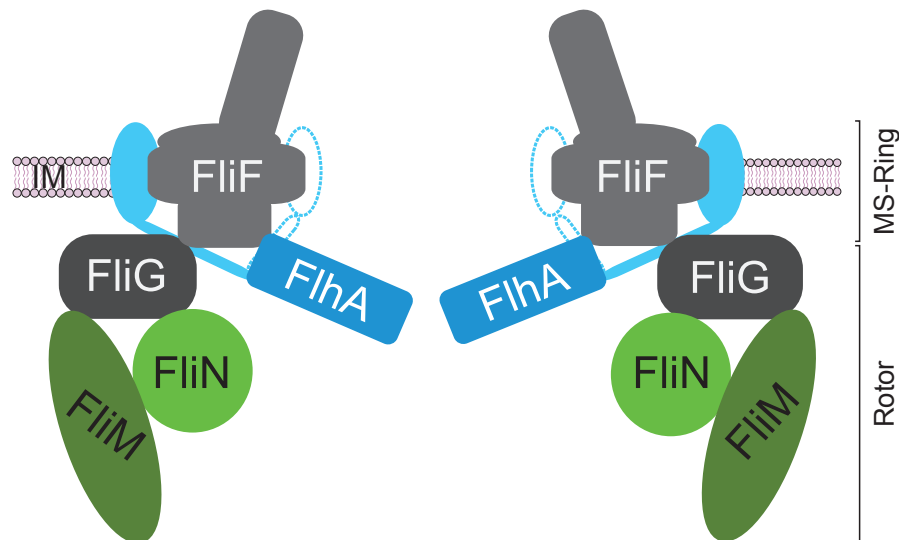


Abbildung 4.3: Modell der Lokalisierung von FlhA innerhalb der Strukturen des MS-Ringes und des zytoplasmatischen Rotors

Die N-terminale Transmembrandomäne von FlhA ist außerhalb des MS-Ringes in der Membran verankert. Über den flexiblen und ausreichend langen Linker wird die zytoplasmatische Domäne innerhalb des MS-Ringes positioniert und kann dort mit anderen Komponenten und Substraten interagieren. Die gestrichelte Linie deutet an, dass die Transmembrandomänen einiger FlhA Moleküle auch innerhalb des MS-Ringes verankert sein können.

Farbkodierung: C-terminale zytoplasmatische Domäne von FlhA (dunkelblau), N-terminale Transmembrandomäne und der flexible Linker von FlhA (hellblau), alternative Positionierung der N-terminalen Transmembrandomäne von FlhA (gestrichelte hellblaue Linie), MS-Ring: FliF (hellgrau), Rotorkomponenten: FliM (dunkelgrün), FliN (hellgrün), FliG (dunkelgrau)

Die Abbildung wurde aus Li und Sourjik, 2011 [87] entnommen und modifiziert.

von FlhA außerhalb des MS-Ringes (FliF) in der Membran verankert. Der flexible Linker gewährleistet aber, dass die C-terminale zytoplasmatische Domäne innerhalb des MS-Ringes positioniert werden kann. Somit kann die zytoplasmatische Domäne Wechselwirkungen mit sich selbst, mit anderen Komponenten und mit Substraten des T3SS eingehen.

Solch ein Modell kann natürlich nicht einfach für das NF-T3SS übernommen werden, da sich einige Strukturen unterscheiden. Statt des MS-Ringes, bestehend aus FlhF im Flagellum, gibt es in *Y. enterocolitica* zwei Ringe in der inneren Membran, die von YscD und YscJ aufgebaut werden. Weiterhin fehlt der Rotor-Komplex der Flagellen

im NF-T3SS. Stattdessen gibt es den putativen C-Ring, welcher in *Y. enterocolitica* vermutlich von YscQ aufgebaut wird. Die Strukturen und Wechselwirkungen im Detail bringen also einige Unterschiede zwischen Flagellum und NF-T3SS zu Tage. Trotzdem liefert dieses Modell auch für das NF-T3SS eine grundsätzliche Erklärung dafür, wie selbst große Oligomere von YscV in den T3S Apparat integriert werden könnten.

Aus dem hier besprochenen Modell ergibt sich die Hypothese für eine mögliche Funktion von YscV. Die Protonenmotorische Kraft (PMF), welche vermutlich maßgeblich die Translokation energetisiert, muss über eine der Komponenten des T3SS in eine, die Translokation antreibende, Bewegung umgesetzt werden [100, 173]. Für den Sec-Proteintransportweg wird vermutet, dass der Influx von Protonen direkt die Proteintranslokation antreibt [5]. YscV wäre für diese Funktion sehr gut geeignet. Es besitzt eine sehr große Transmembrandomäne mit vermutlich 8 Transmembranhelices und eine zytoplasmatische Domäne, die mit den Substraten des T3SS interagiert. Sie ist über einen Linker mit der Transmembrandomäne verbunden, welche eine Flexibilität in der Ausrichtung der zytoplasmatischen Domäne relativ zur Membran erlaubt. Ein Vergleich der Kristallstrukturen der Homologen FlhA und InvA aus *S. enterica* und FlhA aus *Helicobacter pylori* zeigte außerdem, dass die zytoplasmatische Domäne selbst einen Konformationswechsel zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation eingeht [136, 176, 103]. Die Befunde, dass YscV vermutlich in großer Kopienzahl im T3SS vorliegt und Ringstrukturen ausbildet, ergänzen das folgende Modell. YscV ist in einer Ring-förmigen Struktur in der inneren Membran verankert und umgibt die beiden anderen Ringstrukturen, bestehend aus YscJ und YscD. Die großen zytoplasmatischen Domänen bilden dadurch eine Ring-förmige Pore, welche in das Zytoplasma hineinragt und zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation wechseln kann. Somit könnte über die Transmembrandomäne von YscV die PMF in eine Bewegung der zytoplasmatischen Domäne umgesetzt werden, welche den Durchtritt der Substrate gestatten und die Translokation der Substrate antreiben würde.

4.4 Die YscV Oligomere bilden stabile Ringstrukturen aus

Die Tatsache, dass YscV_c große oligomere Komplexe bildet, warf die Frage auf, wie diese Komplexe strukturell organisiert sind. Die Grundsymmetrie des Typ-III-Sekretionssystems ist eine radiärsymmetrische. Die großen Hauptkomponenten, wie z.B. YscC, YscJ und YscD, welche in der Bakterienmembran den Basalkörper aufbauen, bilden alle Ringstrukturen aus [58]. Daher wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die YscV Oligomere ebenfalls eine Ringstruktur einnehmen, weil diese sich am besten mit der gegebenen Grundsymmetrie des T3S-Apparates

vereinbaren ließe.

Diese Annahme konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativ kontrastierten YscV_c-Komplexen auch bestätigt werden. Für die verkürzte Variante der zytoplasmatischen Domäne MBPYscV_{c378} konnten eindeutig Ringstrukturen gezeigt werden. Diese lagen in drei typischen Größen vor: 12 nm, 23.5 nm und 45 nm. Spreter *et al.* identifizierten in allen drei kristallisierten periplasmatischen Domänen der Ring-bildenden Proteine EscC (*E. coli*), EscJ (*E. coli*) und PrgH (*S. enterica*) ein konserviertes Strukturmotiv, trotz völlig fehlender Sequenz-Ähnlichkeiten [151]. In Abbildung 4.4 ist dieses Motiv gezeigt und den konservierten Strukturmotiven aus den verschiedenen Proteinen vergleichend gegenübergestellt. Sie postulierten,

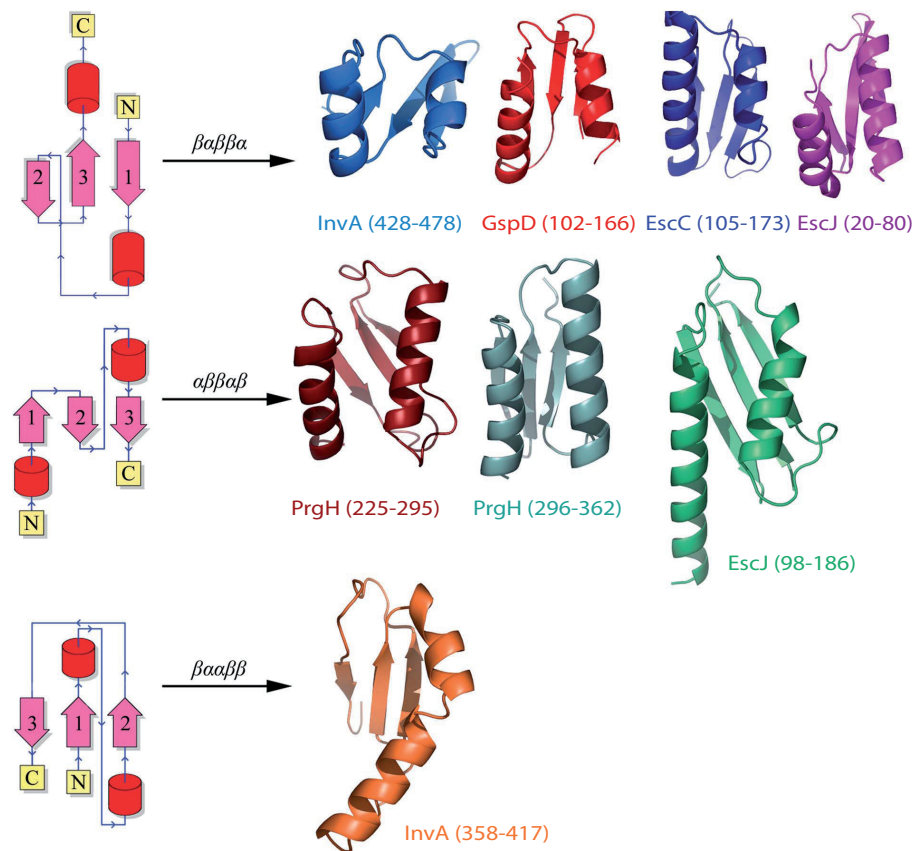


Abbildung 4.4: Die T3SS Membranproteine teilen konservierte Struktur-motive in ihren periplasmatischen/zytoplasmatischen Domänen

Links: Drei Gruppen von Faltungsmotiven wurden identifiziert. Für jede dieser Gruppen ist die Faltung des Motivs schematisch dargestellt. Die sehr ähnlichen 3D-Topologien entstehen durch eine völlig unterschiedliche Verknüpfung der einzelnen Sekundärstruktur-motive. Rechts: Gezeigt sind zwei Struktur-motive aus der zytoplasmatischen Domäne von InvA (*S. enterica*) und die konservierten Motive aus den periplasmatischen Domänen von EscC (Sekretin im T3SS, *E. coli*), GspD (Sekretin im T2SS, *E. coli*), EscJ (IMR im T3SS, *E. coli*) und PrgH (IMR im T3SS, *S. enterica*). Die Abbildung wurde aus Lilic *et al.* [88] entnommen.

dass dieses Strukturmotiv das zentrale Ring-bildende Motiv in diesen Proteinen darstellt und somit, dass die Ringbildung durch die periplasmatischen Domänen dieser Proteine vermittelt wird. Die Kristallisierung der zytoplasmatischen Domäne

von InvA, dem YscV Homolog des NF-T3SS in *S. enterica*, brachte nun die überraschende Erkenntnis, dass auch in der zytoplasmatischen Domäne von InvA solch ein konserviertes Faltungsmotiv vorkommt. Ein Homologie-basiertes 3D-Modell der zytoplasmatischen Domäne von YscV, welches basierend auf der Kristallstruktur der zytoplasmatischen Domäne von InvA berechnet wurde, gibt zunächst keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines solchen Motivs (siehe Ergebnisse, Abb. 3.3). Zuverlässige Aussagen ließen sich jedoch nur mit einer Kristallstruktur von YscV_c beantworten. Da YscV und InvA aber hoch-konservierte Proteine mit vermutlich homologer Funktion sind, ist dies nicht unwahrscheinlich und würde den Befund dieser Arbeit, dass YscV_c hochmolekulare Ringstrukturen ausbildet, weiter unterstützen. Die alleinige Existenz eines solchen Strukturmotivs wäre jedoch kein ausreichender Beweis, da für InvA, trotz vorhandenem Motiv, in Lösung keine Oligomerisierung gezeigt werden konnte.

4.5 YscV_c interagiert mit einem sekretierten Regulator des T3SS

Aus *Y. enterocolitica* selbst gibt es bisher kaum Daten zur Wechselwirkung zwischen YscV und anderen Komponenten oder den Substraten des T3S-Apparates. Erste Experimente deuten eine Wechselwirkung mit YscU an, eine weitere Komponente des Exportapparates in *Yersinia* [172]. Für YscU konnte wiederum eine Interaktion mit dem ATPase Komplex nachgewiesen werden [128]. Diese Interaktion konnte auch für das YscU Homolog FlhB in Flagellen aus *S. enterica* gezeigt werden und bestätigt die homologe Funktion dieser konservierten Proteine [99].

Mit dem YscV Homolog aus Flagellen, FlhA, sind jedoch zahlreiche Studien in *S. enterica* durchgeführt wurden, in deren Verlauf mehrere Interaktionspartner von FlhA identifiziert wurden. Dazu zählen die Membrankomponenten FlhB und FliF (MS-Ring, innere Membran), die Komponenten des ATPase Komplexes FliI (ATPase), FliH (negativer ATPase Regulator) und FliJ (vermutlich generelles Chaperon) und mehrere Substrate, wie z.B. das Flagellin FliC [99, 179, 87]. Für den ATPase Komplex der F-T3SS und der NF-T3SS konnte wiederum gezeigt werden, dass er Substrate im Zytosol rekrutiert, dem T3SS zuführt und die Freisetzung der Substrate vom Chaperon katalysiert [158, 3]. Daher existiert das Modell, dass die Exportapparatkomponenten FlhA und FlhB als Andockstelle für ATPase:Substrat Komplexe fungieren und der anschließenden Einschleusung der Substrate in den Translokationskanal dienen. Neueste Arbeiten an FlhA aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* haben jetzt außerdem gezeigt, dass FlhA mit den Filament-bildenden Proteinen FliC und FliD interagiert [9]. Damit kommt eine ganz neue Substratklasse als Wechselwirkungspartner von FlhA dazu, nämlich die Substrate der späten Phase

der Flagellenassemblierung.

Ein weiterer Beweis für eine intensive Wechselwirkung von FlhA mit anderen Komponenten des F-T3SS liefern Experimente zur Überexpression der zytoplasmatischen Domäne. Diese Überexpression in *S. enterica* Wildtypstämmen führt durch die Titration von anderen Komponenten/Substraten zu einer starken Inhibition der Flagellen-abhängigen Motilität der Bakterien [99, 137, 101]. Die Überproduktion von FlhB hat im Gegensatz dazu keinen Einfluß auf die Motilität. All diese Ergebnisse zeigen ganz klar, dass FlhA eine zentrale Rolle in der Assemblierung der Flagellen spielt und damit essentiell für deren Funktion ist. Die genaue Funktion oder der Mechanismus von FlhA ist damit jedoch noch nicht geklärt. Dies trifft ebenso auf die Homologen von FlhA zu.

Daher wurde zunächst überprüft, ob die Überproduktion von YscV_c ebenfalls einen Einfluß auf die Funktionalität des T3SS besitzt, indem die Yop-Sekretion in den Kulturüberstand von *Y. enterocolitica* WA-314 analysiert wurde. Obwohl die Überexpression sowohl der zytoplasmatischen Domäne als auch des Vollängenproteins zur Aggregation in *inclusion bodies* führt, resultierte sie in einer sehr starken Inhibition der Yop-Sekretion und bestätigt damit die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem Flagellenhomolog FlhA. Das heißt, die Überproduktion von YscV_c führt zur Titration von anderen Komponenten bzw. Substraten, welche dadurch nicht mehr für den T3S-Apparat bzw. für die Sekretion zur Verfügung stehen. In den aggregierten Proteinen scheinen noch genügend Sekundärstrukturanteile vorhanden zu sein, um diese Wechselwirkungen einzugehen.

Übereinstimmend damit konnten die Substrate YopH, YopE und LcrV assoziiert mit den *inclusion bodies* mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Interaktion von YscV_c mit aufgereinigten Proteinen untersucht, welche Substrate des T3SS in verschiedenen Stadien des Assemblierungs- und Sekretionsprozesses repräsentieren. Dazu zählten YscF (Nadelprotein) als prä-assemblierter Komplex mit seinen Chaperonen YscEG, LcrV (Nadelspitzenprotein, bildet eigene Substratklasse mit den Translokatoren), YscM1 und YscM2 (sekretierte Regulatoren), YopH (sekretiertes Effektorprotein) und SycH (Chaperon von YopH) verwendet. Die Wechselwirkungen wurden in der Nativ-PAGE und mit chemischem Crosslinking analysiert.

In der Nativ-PAGE konnte eine putative Wechselwirkung zwischen YscV_c und YopH bzw. einem prä-assemblierten Komplex aus YopH/SycH, aber nicht SycH alleine, identifiziert werden. Diese Wechselwirkungen konnten jedoch nicht im Crosslinking bestätigt werden. Das wichtigste Ergebnis der Crosslinking Analysen ist die identifizierte Interaktion zwischen YscV_c und YscM2, welche sich auch in der Nativ-PAGE angedeutet hatte.

Insgesamt betrachtet war die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Und es besteht durchaus die Möglichkeit, dass auch mit den anderen getesteten Substraten

Wechselwirkungen *in vivo* stattfinden, welche mit den hier angewendeten Methoden nicht erfasst wurden. Zum Einen waren die Ergebnisse der Nativ-PAGE und der Crosslinking Analysen widersprüchlich. Zum Anderen war die Auswertung der Crosslinking Versuche nicht einfach, weil aufgrund des sehr dynamischen Oligomerisierungsgleichgewichtes von YscV_c ein starkes Schmiersignal in den Crosslinking Ansätzen erzeugt wurde, dem sich keine definierten oligomeren Komplexe zuordnen lassen. Dass mit den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen für die meisten getesteten Substrate keine Wechselwirkungen gezeigt werden konnten, könnte außerdem die folgenden methodische Gründe haben:

(1) Man muss davon ausgehen, dass die *in vivo* Wechselwirkungen zwischen YscV und Substraten des T3SS nur transient sind, da hochaffine Wechselwirkungen den dynamischen Prozess der T3SS Assemblierung und Sekretion unmöglich machen würden. Das macht die Darstellung solcher Wechselwirkungen *in vitro* äußerst schwierig, besonders mit den Methoden der Nativ-PAGE, bei der gebildete Komplexe jederzeit wieder dissoziieren können. In Interaktionsstudien mit FlhA, welche auf einem Affinitäts Blot Verfahren basierten, konnten mehrere sekretierte Substrate als Interaktionspartner von FlhA identifiziert werden [99]. (2) Es könnten *in vitro* Faktoren fehlen, welche *in vivo* essentiell für eine Interaktion sind. (3) Die Wechselwirkung mit einigen Proteinen könnte über einen der zytoplasmatischen Loops stattfinden, welche sich im N-Terminus oder zwischen einigen der 8 Transmembranhelices befinden. So wurden z.B. zahlreiche FlhI Suppressormutanten in FlhA identifiziert, welche sich alle in dem N-terminalen zytoplasmatischen Bereich vor der ersten Transmembranhelix von FlhA befanden [98].

Die Wechselwirkung zwischen YscV und YscM2 ist vor dem Hintergrund der Funktion von YscM2 sehr interessant.

YscM2 ist ein Regulator der Yop-Expression, welcher, eingebunden in ein regulatorisches Netzwerk bestehend aus YscM1, YscM2, SycH und YopD, die Expression der Yops inhibiert. Erst die Translokation von YscM2 (und YscM1) nach dem Kontakt zu einer Wirtszelle führt zur Aktivierung der *yop* Gene [27, 28]. Der Mechanismus dieser Regulation besteht vermutlich in der Bindung dieser Faktoren an spezifische Sequenzen in der 5'-UTR der *yop*-mRNAs [27]. YscV könnte also durch die Interaktion mit YscM2 indirekt in die Regulation der Yop-Expression involviert sein.

Diese regulatorische Funktion von YscV könnte aber auch noch direkter Art sein. Die Kristallisierung der zytoplasmatischen Domäne des Flagellenhomologs FlhA aus *Helicobacter pylori* ergab nämlich, dass die Tertiärstruktur einer Subdomäne Ähnlichkeit mit einem RNA-Erkennungsmotiv aufweist [103]. Man könnte also spekulieren, dass YscV (und seine Homologen) in die Erkennung von *yop*-mRNA Sequenzen involviert ist und dass diese Erkennung durch die Aktivität von YscM2 vermittelt wird, welches in Kooperation mit YscM1, SycH und YopD die *yop*-mRNAs bindet. Für den Effektor YopQ wurde bereits gezeigt, dass der Transport kotranslational erfolgt und durch die spezifische Bindung von YscM1, YscM2, SycH und YopD an

die *yopQ*-mRNA vermittelt wird [8, 27]. Möglicherweise liefert nun die Interaktion zwischen YscM2 und YscV neue Ansatzpunkte, um einen kotranslationalen Transportmechanismus strukturell genauer zu charakterisieren und zu lokalisieren.

Die Interaktion von YscV mit YscM2 beinhaltet aber noch einen zweiten interessanten Aspekt. In *Y. enterocolitica* gibt es zwei Kopien des *yscM* Genes, welche durch Duplikation entstanden sind und deren Produkte als YscM1 und YscM2 bezeichnet werden. In dieser Arbeit wurden beide Proteine bezüglich der Interaktion mit YscV analysiert, doch nur für YscM2 konnte eine Interaktion gezeigt werden. Bisherige Untersuchungen zeigten jedoch, dass beide Proteine scheinbar funktionell redundant sind. Ihre Sekretion durch das T3SS führt zu einer Induktion der Yop-Expression und ein entsprechender Phänotyp kann nur durch die Deletion beider *yscM*-Gene erzeugt werden [152, 26, 27, 28]. Studien zum Einfluss dieser beiden Proteine auf die Aktivität des Stoffwechselenzyms PEPC deuteten nun zum ersten Mal an, dass es doch funktionelle Unterschiede zwischen ihnen geben muss [142]. Die Ergebnisse der Interaktionsstudien aus dieser Arbeit könnten nun einen weiteren Hinweis dazu liefern, dass diese beiden Proteine nicht redundant sind. Um die Daten aber wirklich einordnen und bewerten zu können, müssen diese Ergebnisse unbedingt *in vivo* validiert werden.

Wenn man das Ergebniss dieser Arbeit mit den Interaktionsstudien zum Flagellenhomolog FlhA aus *S. enterica* und *Bacillus subtilis* zusammenfasst, so zeigt sich vor allem, dass die FlhA/YscV/InvA Familie offensichtlich mit einem sehr breiten Spektrum an T3SS Substraten interagiert. Dies erklärt auch den dramatischen Einfluß der Überexpression von FlhA und YscV auf die T3SS-abhängige Motilität bzw. Yop-Sekretion der Bakterien (wie oben beschrieben). Möglicherweise fungieren die Mitglieder der FlhA/YscV/Inva-Familie als generelle bzw. initiale Andockstelle für T3SS Substrate und nicht nur für bestimmte Komponenten, wie den ATPase Komplex. Wenn die Substrate einmal am T3S-Apparat lokalisiert sind, kann dann z.B. die selektive Einschleusung in den Translokationskanal über andere Komponenten, wie FlhB/YscU, erfolgen. Dieses Modell würde wiederum eine höhere Kopienzahl von YscV nahelegen, da somit der T3S-Apparat zunächst mit mehreren Substraten "beladen" werden könnte, um die anschließende Translokation effektiver zu gestalten.

4.6 Ausblick

Ein wichtiger Befund der EM-Analysen aus dieser Arbeit ist der, dass YscV Ringstrukturen bildet. Leider konnte die statistische Bildauswertung dieser EM-Analysen nicht abgeschlossen werden. Eine vollständige Auswertung dieser Analysen wird die Frage nach dem stöchiometrischen Verhältnis von YscV im T3S Apparat beleuchten.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen der C-terminalen zytoplasmatischen Domänen des NF-T3SS Homologen InvA und des F-T3SS Homologen FlhA, beide aus *S. enterica*, publiziert [88, 176, 136]. Sie zeigen, dass die erste Subdomäne von FlhA der ATP-Bindedomäne eines Proteins ähnelt, welches die ATPase des zirkadianen Systems aus Cyanobakterien bindet. Außerdem besitzen die ersten beiden Subdomänen von InvA strukturelle Ähnlichkeiten mit der vakuolären (V-Typ)-ATPase aus Eukaryoten. Dies legt für YscV eine Interaktion mit der T3SS-spezifischen ATPase YscN nahe. Eine Analyse dieser putativen Wechselwirkungen könnte zu einem besseren Verständnis des Transportprozesses beitragen. Außerdem ließe sich damit überprüfen, ob sich die Ergebnisse aus den Interaktionsstudien der ATPase FlhI mit Komponenten des Exportapparates des F-T3SS auch auf das NF-T3SS übertragen lassen.

Die Wechselwirkungen von YscV mit den beiden Substraten des T3SS, YscM2 und YopH, welche im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, müssen in einem nächsten Schritt durch *in vivo* Analysen bestätigt und weitere mögliche Interaktionspartner von YscV identifiziert werden.

Bisher ist nicht bekannt, welche der strukturellen, zytoplasmatischen Subdomänen von YscV_c und seiner Homologen für die Oligomerisierung, die Wechselwirkung mit anderen Proteinen und möglichen anderen Funktionen von YscV verantwortlich ist. Die Analyse von Mutanten und trunkierten Varianten der zytoplasmatischen Domäne könnte einen besseren Einblick in die strukturelle Umsetzung der vielfältigen Funktionen von YscV geben.

Eine alleinige Analyse der zytoplasmatischen Domäne von YscV und seiner Homologen reicht nicht aus, um deren Funktion vollständig aufzuklären. Analysen zur Funktion der ATPase des F-T3SS aus *S. enterica* ergaben, dass die membranständige Domäne von FlhA ebenfalls eine Rolle spielt [98]. Suppressormutanten, welche die fehlende Motilität in einer FlhI Deletionsmutante zu einem gewissen Teil wieder herstellen, konnten im zytoplasmatischen N-Terminus von FlhA, welcher sich vor der ersten Transmembranhelix befindet, identifiziert werden. Daher sollte bei zukünftigen funktionellen Analysen auch der zytoplasmatische N-Terminus und möglicherweise auch die zytoplasmatischen Loops zwischen den Transmembranhelices berücksichtigt werden.

Frühe genetische Untersuchungen von *yscV* ergaben, dass es möglicherweise als Operon mit *lcrR* vorliegt und daher transkriptionell mit *lcrR* gekoppelt ist [122]. YscV und LcrR besitzen aber gegensätzliche Effekte auf die Induktion der Yops bei 37°C und Ca²⁺-Depletion. YscV trägt zur Induktion der Yops bei während LcrR diesen Prozess reprimiert. Es stellt sich also die Frage nach dem Sinn einer gemeinsamen Regulation. Die vergleichende Charakterisierung der Expression beider Proteine mittels *realtime* RT-PCR und Western Blot könnte zunächst Aufschluss darüber geben, ob die ursprüngliche Annahme tatsächlich der *in vivo* Situation entspricht.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24):14043–14048, 1999.
- [2] S. I. Aizawa. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett*, 202(2):157–164, 2001.
- [3] Y. Akeda and J. E. Galán. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437(7060):911–915, 2005.
- [4] K. Akopyan, T. Edgren, H. Wang-Edgren, R. Rosqvist, A. Fahlgren, H. Wolf-Watz, and M. Fallman. Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
- [5] N.N. Alder and S.M. Theg. Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci*, 28(8):442–451, 2003.
- [6] S. P. Allen, J. O. Polazzi, J. K. Gierse, and A. M. Easton. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bac*, 174(21):6938, 1992.
- [7] D. M. Anderson and O. Schneewind. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, 278(5340):1140, 1997.
- [8] D. M. Anderson and O. Schneewind. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol Microbiol*, 31(4):1139–1148, 1999.
- [9] G. Bange, N. Kummerer, C. Engel, G. Bozkurt, K. Wild, and I. Sinning. FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25):11295–300, 2010.
- [10] J. Bar Tana, B. J. Howlett, and D. E. Koshland Jr. Flagellar formation in *Escherichia coli* electron transport mutants. *J Bac*, 130(2):787, 1977.

- [11] S. S. Barve and S. C. Straley. lcrR, a low-Ca²⁺(+)-response locus with dual Ca²⁺(+)-dependent functions in *Yersinia pestis*. *J Bac*, 172(8):4661–4671, 1990.
- [12] N. Bayan, I. Guilvout, and A. P. Pugsley. Secretins take shape. *Mol Microbiol*, 60(1):1–4, 2006.
- [13] C. Berger, G. P. Robin, U. Bonas, and R. Koebnik. Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Microbiol*, 156(7):1963–1974, 2010.
- [14] N. Bhagat and J. S. Virdi. The Enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *Crit Rev Microbiol*, 0(0):1–15.
- [15] S. C. Birtalan, R. M. Phillips, and P. Ghosh. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell*, 9(5):971–980, 2002.
- [16] D. S. Black and J. B. Bliska. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J*, 16(10):2730–2744, 1997.
- [17] D. S. Black and J. B. Bliska. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol*, 37(3):515–527, 2000.
- [18] B. Blaylock, K. E. Riordan, D. M. Missiakas, and O. Schneewind. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bac*, 188(10):3525–34, 2006.
- [19] E. J. Bottone. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb Infect*, 1(4):323–333, 1999.
- [20] A. P. Boyd, I. Lambermont, and G. R. Cornelis. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bac*, 182(17):4811, 2000.
- [21] I. E. Brodsky, N. W. Palm, S. Sadanand, M. B. Ryndak, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, J. B. Bliska, and R. Medzhitov. A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe*, 7(5):376–87, 2010.
- [22] P. Broz, C. A. Mueller, S. A. Müller, A. Philippsen, I. Sorg, A. Engel, and G. R. Cornelis. Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol*, 65(5):1311–1320, 2007.

- [23] M. Bucher, C. Meyer, B. Grotzbach, S. Wacheck, A. Stolle, and M. Fredriksson-Ahomaa. Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006. *Foodborne Pathog Dis*, 5(3):273–80, 2008.
- [24] P. Burghout, F. Beckers, E. De Wit, R. Van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen, and M. Koster. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bac*, 186(16):5366, 2004.
- [25] P. Burghout, R. Van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bac*, 186(14):4645, 2004.
- [26] E. D. Cambronne, L. W. Cheng, and O. Schneewind. LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia* yop virulon, are injected into host cells by a chaperone dependent mechanism. *Mol Microbiol*, 37(2):263–273, 2000.
- [27] E. D. Cambronne and O. Schneewind. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: YscM1 and YscM2 regulate yop gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of yop mRNA. *J Bac*, 184(21):5880–93, 2002.
- [28] E. D. Cambronne, J. A. Sorg, and O. Schneewind. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J Bac*, 186(3):829–41, 2004.
- [29] E. Carniel. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microb Infect*, 3(7):561–569, 2001.
- [30] L. W. Cheng, D. M. Anderson, and O. Schneewind. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 24(4):757–765, 1997.
- [31] B. China, M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. De Bruyere, and G. R. Cornelis. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun*, 61(8):3129–3136, 1993.
- [32] M. G. Claros and G. Heijne. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comp Appl Biosci*, 10(6):685, 1994.
- [33] F. S. Cordes, K. Komoriya, E. Larquet, S. Yang, E. H. Egelman, A. Blocker, and S. M. Lea. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem*, 278(19):17103–7, 2003.

- [34] G. R. Cornelis. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4(11):811–825, 2006.
- [35] E. A. Creasey, R. M. Delahay, S. J. Daniell, and G. Frankel. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol*, 149(8):2093, 2003.
- [36] Z. S. Derewenda. Rational Protein Crystallization by Mutational Surface Engineering. *Structure*, 12(4):529–535, 2004.
- [37] A. Diepold, M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, and G. R. Cornelis. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J*, 2010.
- [38] J. Dyrlov Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4):783–795, 2004.
- [39] D. Esposito and D. K. Chatterjee. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Op Biotechnol*, 17(4):353–358, 2006.
- [40] A. G. Evdokimov, D. E. Anderson, K. M. Routzahn, and D. S. Waugh. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol*, 312(4):807–821, 2001.
- [41] A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, K. M. Routzahn, and D. S. Waugh. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Act Cryst*, 58(3):398–406, 2002.
- [42] F. Fan and R. M. Macnab. Enzymatic characterization of FliI. *J Biol Chem*, 271(50):31981, 1996.
- [43] F. Fan, K. Ohnishi, N. R. Francis, and R. M. Macnab. The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol Microbiol*, 26(5):1035–1046, 1997.
- [44] O. Fayet, T. Ziegelhoffer, and C. Georgopoulos. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bac*, 171(3):1379, 1989.
- [45] A. Fluegel, H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuehn, L. Sorokin, H. Burkhardt, K. von der Mark, and F. Emmrich. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem*, 269(47):29732–29738, 1994.

- [46] M. Fredriksson-Ahomaa, A. Stolle, and H. Korkeala. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immun Med Microbiol*, 47(3):315–329, 2006.
- [47] J. E. Galan, C. Ginocchio, and P. Costeas. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J Bac*, 174(13):4338, 1992.
- [48] M. Y. Galperin, P. A. Dibrov, and A. N. Glagolev. $\Delta \mu H^+$ is required for flagellar growth in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 143(2):319, 1982.
- [49] J. T. Garcia, F. Ferracci, M. W. Jackson, S. S. Joseph, I. Pattis, L. R. Plano, W. Fischer, and G. V. Plano. Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun*, 74(10):5645–57, 2006.
- [50] J. D. Goguen, J. Yother, and S. C. Straley. Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* μ d1(Ap *lac*) insertion mutants. *J Bac*, 160(3):842, 1984.
- [51] U. Gophna, E. Z. Ron, and D. Graur. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312:151–163, 2003.
- [52] S. Hakansson, T. Bergman, J. C. Vanooteghem, G. Cornelis, and H. Wolf-Watz. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun*, 61(1):71, 1993.
- [53] S. Hakansson, K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Homble, and H. Wolf-Watz. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J*, 15(21):5812, 1996.
- [54] F.-U. Hartl, S. Lecker, E. Schiebel, J. P. Hendrick, and W. Wickner. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell*, 63(2):269–279, 1990.
- [55] C. J. Hück. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2):379–433, 1998.
- [56] S. Y. He, K. Nomura, and T. S. Whittam. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim et Biophys Act - Mol Cell Res*, 1694(1-3):181–206, 2004.

- [57] J. Heesemann and R. Laufs. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bac*, 155(2):761–767, 1983.
- [58] J. L. Hodgkinson, A. Horsley, D. Stabat, M. Simon, S. Johnson, P. C. A. da Fonseca, E. P. Morris, J. S. Wall, S. M. Lea, and A. J. Blocker. Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol*, 16(5):477–485, 2009.
- [59] R. Hoffmann, K. Van Erp, K. Trülsch, and J. Heesemann. Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol*, 6(4):377–390, 2004.
- [60] E. Hoiczky and G. Blobel. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4669, 2001.
- [61] A. Holmström, J. Pettersson, R. Rosqvist, S. Håkansson, F. Tafazoli, M. Fällman, K. E. Magnusson, H. Wolf Watz, and Å Forsberg. YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol*, 24(1):73–91, 1997.
- [62] A. Holmström, R. Rosqvist, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg. Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infect Immun*, 63(6):2269, 1995.
- [63] W. A. Houry, D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and F. U. Hartl. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, 402(6758):147–154, 1999.
- [64] S. L. Howard, M. W. Gaunt, J. Hinds, A. A. Witney, R. Stabler, and B. W. Wren. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bac*, 188(10):3645–3653, 2006.
- [65] M. Iriarte and G. R. Cornelis. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol*, 29(3):915–929, 1998.
- [66] R. R. Isberg and P. Barnes. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci*, 114(Pt 1):21–28, 2001.
- [67] M. W. Jackson and G. V. Plano. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett*, 186(1):85–90, 2000.

- [68] S. Johnson, P. Roversi, M. Espina, A. Olive, J. E. Deane, S. Birket, T. Field, W. D. Picking, A. J. Blocker, and E. E. Galyov. Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem*, 282(6):4035, 2007.
- [69] D. T. Jones. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292(2):195–202, 1999.
- [70] L. Journet, C. Agrain, P. Broz, and G. R. Cornelis. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, 302(5651):1757, 2003.
- [71] L. Kaell, A. Krogh, and E. L. L. Sonnhammer. Phobius: A combined trans-membrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338(5):1027–1036, 2004.
- [72] G. Kapperud, E. Namork, M. Skurnik, and T. Nesbakken. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun*, 55(9):2247, 1987.
- [73] R. B. Kapust and D. S. Waugh. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Prot Sci*, 8(8):1668–1674, 1999.
- [74] E. Katayama, T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S. I. Aizawa. Geometry of the Flagellar Motor in the Cytoplasmic Membrane of *Salmonella typhimurium* as Determined by Stereo-photogrammetry of Quick-freeze Deep-etch Replica Images. *J Mol Biol*, 255(3):458–475, 1996.
- [75] L. A. Kelley and M. J. E. Sternberg. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protocols*, 4(3):363–371, 2009.
- [76] E. J. Kerschen, D. A. Cohen, A. M. Kaplan, and S. C. Straley. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun*, 72(8):4589, 2004.
- [77] P.V. Konarev, M.V. Petoukhov, V.V. Volkov, and D.I. Svergun. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst*, 39(2):277–286, 2006.
- [78] M. Koster, W. Bitter, H. De Cock, and A. Allaoui. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring shaped multimeric complex. *Mol Microbiol*, 26(4):789–797, 1997.

- [79] A. Krogh, B. È Larsson, G. Von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer. TMHMM: Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3):567–580, 2001.
- [80] T. Kubori, Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S.-I. Aizawa. Supramolecular Structure of the *Salmonella typhimurium* Type III Protein Secretion System. *Science*, 280(5363):602–605, 1998.
- [81] J. Kyte and R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1):105–132, 1982.
- [82] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [83] M. Lavander, L. Sundberg, P. J. Edqvist, S. A. Lloyd, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg. Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bac*, 184(16):4500, 2002.
- [84] V. T. Lee, S. K. Mazmanian, and O. Schneewind. A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bac*, 183(17):4970, 2001.
- [85] M. Letzelter, I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G. R. Cornelis. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J*, 25(13):3223–3233, 2006.
- [86] K. Y. Leung, B. S. Reisner, and S. C. Straley. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun*, 58(10):3262, 1990.
- [87] Hui Li and Victor Sourjik. Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2011.
- [88] M. Lilic, C. M. Quezada, and C. E. Stebbins. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. *Act Cryst*, 66(6):709–713, 2010.
- [89] S. A. Lloyd, M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf Watz. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol*, 39(2):520–532, 2001.

- [90] S. A. Lloyd, M. Sjöström, S. Andersson, and H. Wolf Watz. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol*, 43(1):51–59, 2002.
- [91] A. Lo, H. S. Chiu, T. Y. Sung, P. C. Lyu, and W. L. Hsu. SVMTop: Enhanced membrane protein topology prediction using a hierarchical classification method and a new scoring function. *J Prot Res*, 7(2):487–496, 2007.
- [92] M. Locher, B. Lehnert, K. Krauss, J. Heesemann, M. Groll, and G. Wilharm. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J Biol Chem*, 280(35):31149, 2005.
- [93] S. J. Ludtke, J. Jakana, J. L. Song, D. T. Chuang, and W. Chiu. A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN1. *J Mol Biol*, 314(2):253–262, 2001.
- [94] R. M. Macnab. How bacteria assemble flagella. *Ann Rev Microbiol*, 57(1):77–100, 2003.
- [95] T. C. Marlovits, T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan, and V. M. Unger. Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex. *Science*, 306(5698):1040–1042, 2004.
- [96] C. McDonald, P. O. Vacratsis, J. B. Bliska, and J. E. Dixon. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem*, 278(20):18514, 2003.
- [97] T. Michiels, P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruysschaert, and G. Cornelis. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun*, 58(9):2840, 1990.
- [98] T. Minamino, B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, and R. M. Macnab. The ATPase FliI Can Interact with the Type III Flagellar Protein Export Apparatus in the Absence of Its Regulator, FliH. *J Bac*, 185(13):3983–3988, 2003.
- [99] T. Minamino and R. M. Macnab. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol*, 35(5):1052–1064, 2000.
- [100] T. Minamino and K. Namba. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, 451(7177):485–488, 2008.
- [101] T. Minamino, M. Shimada, M. Okabe, Y. Saijo-Hamano, K. Imada, M. Kihara, and K. Namba. Role of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA in bacterial flagellar type III protein export. *J Bac*, 192(7):1929, 2010.

- [102] A. Mogk, E. Deuerling, S. Vorderwulbecke, E. Vierling, and B. Bukau. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol*, 50(2):585–595, 2003.
- [103] S.A. Moore and Y. Jia. Structure of the cytoplasmic domain of the flagellar secretion apparatus component Flha from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 285(27):21060, 2010.
- [104] T. Morita-Ishihara, M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama, and C. Sasakawa. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem*, 281(1):599, 2006.
- [105] L. J. Mota, L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, and G. R. Cornelis. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science*, 307(5713):1278, 2005.
- [106] C. A. Mueller, P. Broz, S. A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand, I. Sorg, M. Kuhn, A. Engel, and G. R. Cornelis. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, 310(5748):674, 2005.
- [107] B. Mulder, T. Michiels, M. Simonet, M.P. Sory, and G. Cornelis. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun*, 57(8):2534, 1989.
- [108] J. Naktin and K. G. Beavis. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Clin Lab Med*, 19(3):523, 1999.
- [109] L. Navarro, A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor, and J. E. Dixon. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell*, 26(4):465–477, 2007.
- [110] W. Neumayer, M. Groll, V. Lehmann, U. Antoneka, S. Kahler, J. Heesemann, and G. Wilharm. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Prot Expr Purif*, 35(2):237–47, 2004.
- [111] K. Nishihara, M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 66(3):884–889, 2000.
- [112] D. A. Parsell and R. T. Sauer. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev*, 3(8):1226, 1989.

- [113] C. Parsot, C. Hamiaux, and A. L. Page. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Op Microbiol*, 6(1):7–14, 2003.
- [114] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–3567, 1999.
- [115] C. Persson, N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fällman. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J*, 16(9):2307–2318, 1997.
- [116] C. Persson, R. Nordfelth, and A. Holmström. Cell surface bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol*, 18(1):135–150, 1995.
- [117] M. V. Petoukhov and D. I. Svergun. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J*, 89(2):1237–1250, 2005.
- [118] J. Pettersson, A. Holmström, J. Hill, S. Leary, E. Frithz Lindsten, A. von Euler Matell, E. Carlsson, R. Titball, Å Forsberg, and H. Wolf Watz. The V antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol*, 32(5):961–976, 1999.
- [119] J. Pettersson, R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, 273(5279):1231–1233, 1996.
- [120] J. Phan, K. Lee, S. Cherry, J. E. Tropea, T. R. Burke, and D. S. Waugh. High-resolution structure of the *Yersinia pestis* protein tyrosine phosphatase YopH in complex with a phosphotyrosyl mimetic-containing hexapeptide. *Biochem*, 42(45):13113–13121, 2003.
- [121] J. Phan, J. E. Tropea, and D. S. Waugh. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Act Cryst*, 60(Pt 9):1591–9, 2004.
- [122] G. V. Plano, S. S. Barve, and S. C. Straley. LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J Bac*, 173(22):7293–303, 1991.
- [123] G. V. Plano and S. C. Straley. Multiple effects of *lcrD* mutations in *Yersinia pestis*. *J Bac*, 175(11):3536–45, 1993.

- [124] G. Prehna, M. I. Ivanov, J. B. Bliska, and C. Stebbins. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell*, 126(5):869–880, 2006.
- [125] K. S. Ramamurthi and O. Schneewind. *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol*, 50(4):1189–1198, 2003.
- [126] E. Ratajczak, S. Zietkiewicz, and K. Liberek. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *J Mol Biol*, 386(1):178–189, 2009.
- [127] D. Reithmeier-Rost, J. Hill, S.J. Elvin, D. Williamson, S. Dittmann, A. Schmid, G. Wilharm, and A. Sing. The weak interaction of LcrV and TLR2 does not contribute to the virulence of *Yersinia pestis*. *Microb Infect*, 9(8):997–1002, 2007.
- [128] K. E. Riordan and O. Schneewind. YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol*, 68(6):1485–1501, 2008.
- [129] A. Roggenkamp, N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA. *J Bac*, 185(13):3735–3744, 2003.
- [130] A. Roggenkamp, H. R. Neuberger, A. Flgel, T. Schmoll, and J. Heesemann. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol*, 16(6):1207–1219, 1995.
- [131] J. R. Rohde, X. Luan, H. Rohde, J. M. Fox, and S. A. Minnich. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37°C. *J Bac*, 181(14):4198, 1999.
- [132] C. L. Rouvroit, C. Sluiter, and G. R. Cornelis. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 6(3):395–409, 1992.
- [133] M. W. Rössle, R. Klaering, U. Ristau, B. Robrahn, D. Jahn, T. Gehrman, P. Konarev, A. Round, S. Fiedler, C. Hermes, and D. Svergun. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J Appl Cryst*, 40(s1):s190–s194, 2007.
- [134] C. Rüter, C. Buss, J. Scharnert, G. Heusipp, and M. A. Schmidt. A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *J Cell Sci*, 123(Pt 13):2190, 2010.

- [135] K. Ruckdeschel, A. Deuretzbacher, and R. Haase. Crosstalk of signalling processes of innate immunity with *Yersinia* Yop effector functions. *Immunobiol*, 213(3-4):261–269, 2008.
- [136] Y. Saijo-Hamano, K. Imada, T. Minamino, M. Kihara, M. Shimada, A. Kitao, and K. Namba. Structure of the cytoplasmic domain of FlhA and implication for flagellar type III protein export. *Mol Microbiol*, 2010.
- [137] Y. Saijo-Hamano, T. Minamino, R. M. Macnab, and K. Namba. Structural and functional analysis of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA, an integral membrane component of the type III flagellar protein export apparatus in *Salmonella*. *J Mol Biol*, 343(2):457–466, 2004.
- [138] M. R. Sarker, C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bac*, 180(5):1207, 1998.
- [139] N. Sauvonnnet, B. Pradet-Balade, J. A. Garcia-Sanz, and G. R. Cornelis. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. *J Biol Chem*, 277(28):25133, 2002.
- [140] H. Schägger and G. von Jagow. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199(2):223–231, 1991.
- [141] A. Schmid. *Analyse von Regulatorproteinen des Yersinia Typ III Sekretions-systems: Bedeutung Typ III-spezifischer Chaperone and Kontrolle der Aktivitaet der Phosphoenolpyruvatcarboxylase*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, 2008.
- [142] A. Schmid, W. Neumayer, K. Trülsch, L. Israel, A. Imhof, M. Rössle, G. Sauer, S. Richter, S. Lauw, and E. Eylert. Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J Biol Chem*, 284(18):12165, 2009.
- [143] F. D. Schubot, M. W. Jackson, K. J. Penrose, S. Cherry, J. E. Tropea, G. V. Plano, and D. S. Waugh. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J Mol Biol*, 346(4):1147–1161, 2005.
- [144] R. Schulte, S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault, and I. B. Autenrieth. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to $\beta 1$ integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol*, 2(2):173–185, 2000.

- [145] H. Schulze-Koops, H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmrich. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun*, 60(6):2153–2159, 1992.
- [146] F. Shao, P. O. Vacratsis, Z. Bao, K. E. Bowers, C. A. Fierke, and J. E. Dixon. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):904, 2003.
- [147] Feng Shao. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Op Microbiol*, 11(1):21–29, 2008.
- [148] E. Skrzypek, C. Cowan, and S. C. Straley. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol*, 30(5):1051–1065, 1998.
- [149] Isabel Sorg, Stefanie Wagner, Marlise Amstutz, Shirley A. Muller, Petr Broz, Yvonne Lussi, Andreas Engel, and Guy R. Cornelis. YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J*, 26(12):3015–3024, 2007.
- [150] M. P. Sory, A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26):11998, 1995.
- [151] T. Spreter, C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller, and N. C. Strynadka. A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 16(5):468–76, 2009.
- [152] I. Stainier, M. Iriarte, and G. R. Cornelis. YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of yop transcription. *Mol Microbiol*, 26(4):833–43, 1997.
- [153] C. E. Stebbins and J. E. Galán. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, 414(6859):77–81, 2001.
- [154] S.C. Straley and M.L. Cibull. Differential clearance and host-pathogen interactions of YopE-and YopK-YopL-*Yersinia pestis* in BALB/c mice. *Infect Immun*, 57(4):1200, 1989.

- [155] J. P. Sun, L. Wu, A. A. Fedorov, S. C. Almo, and Z. Y. Zhang. Crystal structure of the *Yersinia* protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small molecule inhibitor. *J Biol Chem*, 278(35):33392, 2003.
- [156] F. Tardy, F. Homble, C. Neyt, R. Wattiez, G. R. Cornelis, J. M. Ruyschaert, and V. Cabiliaux. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J*, 18(23):6793–9, 1999.
- [157] R. Tertti, M. Skurnik, T. Vartio, and P. Kuusela. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun*, 60(7):3021–3024, 1992.
- [158] J. Thomas, G. P. Stafford, and C. Hughes. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(11):3945, 2004.
- [159] S.E. Thorslund, T. Edgren, J. Pettersson, R. Nordfelth, M.E. Sellin, E. Ivanova, M.S. Francis, E.L. Isaksson, H. Wolf-Watz, and M. Fällman. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* virulence function. *PloS One*, 6(2):309–324, 2011.
- [160] C. B. Trame and D. B. McKay. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Act Cryst*, 59(2):389–392, 2003.
- [161] P. Troisfontaines and G. R. Cornelis. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology*, 20:326, 2005.
- [162] K. Truelzsch, A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel, and J. Heesemann. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol*, 293(2-3):167–177, 2003.
- [163] K. Truelzsch, T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Russmann, and J. Heesemann. Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun*, 72(9):5227–34, 2004.
- [164] M. Van Heel, G. Harauz, E. V. Orlova, R. Schmidt, and M. Schatz. A new generation of the IMAGIC image processing system. *J Struct Biol*, 116:17–24, 1996.
- [165] A. K. J. Veenendaal, J. L. Hodgkinson, L. Schwarzer, D. Stabat, S. F. Zenk, and A. J. Blocker. The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol*, 63(6):1719–1730, 2007.

- [166] G. I. Viboud and J. B. Bliska. A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J*, 20(19):5373–5382, 2001.
- [167] G. I. Viboud, S. S. K. So, M. B. Ryndak, and J. B. Bliska. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*, 47(5):1305–1315, 2003.
- [168] P. Wattiau, B. Bernier, P. Deslée, T. Michiels, and G. R. Cornelis. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(22):10493, 1994.
- [169] P. Wattiau and G. R. Cornells. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol Microbiol*, 8(1):123–131, 1993.
- [170] G. Wauters, K. Kandolo, and M. Janssens. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immun*, 9:14, 1987.
- [171] N. P. West, P. Sansonetti, J. Mounier, R. M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M. C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, and M. Tanguy. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science*, 307(5713):1313, 2005.
- [172] U. Wiesand. *Structural and Biochemical Investigation of the Yersinia enterocolitica Type III Secretion Export Apparatus*. PhD thesis, Technische Universitaet Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, 2010.
- [173] G. Wilharm, S. Dittmann, A. Schmid, and J. Heesemann. On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol*, 297(1):27–36, 2007.
- [174] G. Wilharm, V. Lehmann, K. Krauss, B. Lehnert, S. Richter, K. Ruckdeschel, J. Heesemann, and K. Truelzsch. *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun*, 72(7):4004, 2004.
- [175] G. Wilharm, W. Neumayer, and J. Heesemann. Recombinant *Yersinia enterocolitica* YscM1 and YscM2: homodimer formation and susceptibility to thrombin cleavage. *Prot Expr Purif*, 31(2):167–72, 2003.
- [176] L. J. Worrall, M. Vuckovic, and N. C. J. Strynadka. Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA. *Prot Sci*, 19(5):1091–1096, 2010.

- [177] B. W. Wren. The *Yersiniae*: a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 1(1):55–64, 2003.
- [178] C. K. Yip, T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. Finlay, S. I. Miller, and N. C. J. Strynadka. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, 435(7042):702–707, 2005.
- [179] K. Zhu, B. González-Pedrajo, and R. M. Macnab. Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Biochem*, 41(30):9516–9524, 2002.
- [180] R. Zumbihl, M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem*, 274(41):29289, 1999.

Danksagung

Zu allererst und in ganz besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Mentor Gottfried Wilharm bedanken. Er hat mir jederzeit alle Möglichkeiten gegeben, meine eigenen wissenschaftlichen Ideen einzubringen und im Labor umzusetzen, an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen, um die Ergebnisse meiner Arbeit zu präsentieren, und mich auch über den Rahmen meiner Promotion hinaus weiterzubilden und damit das Interesse für andere Disziplinen wach zu halten. Für sein Vertrauen in meine Arbeit, die vielen anregenden und wissenschaftenden Diskussionen und das herzliche Arbeitsklima möchte ich mich sehr bedanken.

Ich danke Prof. Jahn sehr für die kurzfristige und unkomplizierte Übernahme des Erstgutachtens!

Weiterhin möchte ich unseren Kooperationspartnern danken: Dr. Nathalie Braun und Prof. Sevil Weinkauff (TU München) für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen, Dr. Manfred Rössle (EMBL, Hamburg) für die umfassende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der SAXS-Experimente und Dr. Guido Sauer (MPI, Tübingen) für die massenspektrometrischen Analysen.

Ich danke meinem Freund Tobias für die gemeinsame und sehr intensive Arbeitszeit in und außerhalb des Labors, die wir, wie ich finde, wirklich toll gemeistert haben! Außerdem möchte ich mich auch bei Evelyn und Julia bedanken! Das herzliche Arbeitsklima in unserer kleinen Arbeitsgruppe hat dazu beigetragen, dass ich mich auch in schwierigen Phasen der Arbeit jeden Tag aufs Neue motivieren konnte!

Mit einem Lächeln im Gesicht möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen des Institutes bedanken, die mir gute Freunde geworden sind, insbesondere bei Princessa Jennycita, Kevin, Henning, (Tiger-)Jenny, Guido, Franzi, Roman, Kathrin, Anne, Andreas, Direktor Brandt und Seppi. Es war einfach eine schöne Zeit!

Lang lebe Café-Tille!

Ganz nach dem Motto - das Beste kommt zuletzt- gilt abschließend mein aufrichtiger Dank meinen Eltern Mara und Renaldo Faber. Sie sind mir ein großes Vorbild für mein berufliches Streben und haben mich immer und in jeder Hinsicht während meines Studiums und meiner Promotion unterstützt und motiviert.